



**ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΡΑΣΙΝΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ
&
ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

Γρηγόριος Τάτσης

Διπλωματική Εργασία
ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας,
Αναστασίας Δέτση

ΤΟΜΕΑΣ Ι: Χημικές Επιστήμες
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΑΘΗΝΑ, 2021



TARGETED DESIGN AND SYNTHESIS OF GREEN SOLVENTS

&

THEIR UTILIZATION IN THE DEVELOPMENT OF INNOVATIVE PRODUCTS

Diploma Thesis

by Grigorios Tatsis

National Technical University of Athens

School of Chemical Engineering

Supervisor: Anastasia Detsi, Associate Professor

DEPARTMENT I: Chemical Sciences

ORGANIC CHEMISTRY LABORATORY

ATHENS, 2021

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί πρωτότυπο ερευνητικό έργο υλοποιημένο μετά ενδελεχούς επιστημονικής έρευνας κατά το ακαδημαϊκό έτος 2020-2021 στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ με επιβλέπουσα την αξιότιμη Αναπληρώτρια Καθηγήτρια της Σχολής, κα [Αναστασία Δέτση](#).

Απευθύνω τις εκ βαθέων θερμότερες ευχαριστίες στην υπεύθυνη καθηγήτρια Αναστασία Δέτση για την αποδοχή σύμπραξης και συνεργασίας στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας και την ανάθεση μελέτης του πλέον καινοτόμου ερευνητικού θέματος που πραγματεύεται η εργασία. Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Δρ. Ανδρομάχη Τζάνη για την πολύτιμη καθοδήγηση και μεταλαμπαδέυση εμπειρίας και γνώσεων, ενώ δε θα μπορούσα σε καμία περίπτωση να παραλείψω να εκφράσω απέραντα λόγια ευχαριστίας για την απεριόριστη καθοδήγηση που μου προσέφερε η Υποψήφια Διδάκτορας Ιωάννα Πιττερού στη μελέτη των νανοσυστημάτων. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Υποψήφια Διδάκτορα Μαρία Μπαϊρακτάρη για την μύηση στη μέθοδο μελέτης του DNA-συμπλόκου, καθώς και να ασκήσω ιδιαίτερη μνεία σε όλους τους συμφοιτητές για τη συνεργασία και το υπέροχο κλίμα που επικρατούσε στο εργαστήριο. Τέλος, ευχαριστώ και τους δικούς μου ανθρώπους, η στήριξη των οποίων διετέλεσε αρωγός στην πραγματοποίηση των σπουδών μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Καθηγήτρια κα Ευαγγελία Παυλάτου και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κο Γεώργιο Στεφανίδη για το χρόνο και την προσπάθεια που αφιέρωσαν στην κριτική ανάγνωση της διπλωματικής εργασίας μου και την τέλεση ως μέλη της εξεταστικής επιτροπής.

Περίληψη

Είναι σημείο των καιρών η τάση που διέπει την ανθρώπινη σκέψη προς στροφή σε ένα πιο «πράσινο» τρόπο ζωής, πιο βιώσιμο. Έτσι και η χημική βιομηχανία αναζητά τρόπους και μέσα για το σχεδιασμό πράσινων τεχνολογιών και βιώσιμων προϊόντων. Η παρούσα εργασία κινείται στους άξονες της Πράσινης Χημείας και Μηχανικής και της Φαρμακευτικής, αξιοποιώντας φιλικότερους για το περιβάλλον και τον άνθρωπο διαλύτες για την πράσινη εκχύλιση του τζίντζερ και τον εγκλεισμό και την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας της κουρκουμίνης για χρήση της σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκου.

Οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες και τα ιοντικά υγρά αποτελούν δύο υποσχόμενες κατηγορίες πράσινων διαλυτών με, γενικά, χαμηλή τοξικότητα, υψηλή βιοδαποκοδομησιμότητα, μεγάλη ποικιλία και ευρύ φάσμα εφαρμογών. Στο πρώτο μέρος της εργασίας γίνεται σύνθεση και χαρακτηρισμός τέτοιων διαλυτών με έμφαση στο CAGE (1:2) (χολίνη:γερανικό οξύ). Ο χαρακτηρισμός γίνεται μέσω φασματοσκοπίας ^1H NMR και FT-IR. Για πρώτη φορά συντίθεται ο διαλύτης BAGE (1:3.5) (βεταΐνη:γερανικό οξύ). Τα ιοντικά υγρά που συντίθενται είναι η υδροξυχολίνη με λεβουλνικό οξύ ή βανιλικό οξύ ή δωδεκανοϊκό οξύ σε αναλογία moles (1:1), επίσης, το CAGE (1:1) και (1:2). Τα ιοντικά υγρά, υδροξυχολίνη-λεβουλνικό οξύ και CAGE (1:2), μελετώνται ως πλαστικοποιητές σε φιλμ χιτοζάνης. Εκτός των άλλων, οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες και τα ιοντικά υγρά αποτελούν εξαιρετικά εκχυλιστικά μέσα με ιδιαίτερη ικανότητα διάλυσης βιοδραστικών ενώσεων, λειτουργώντας σταθεροποιητικά και προστατευτικά ως προς αυτές.

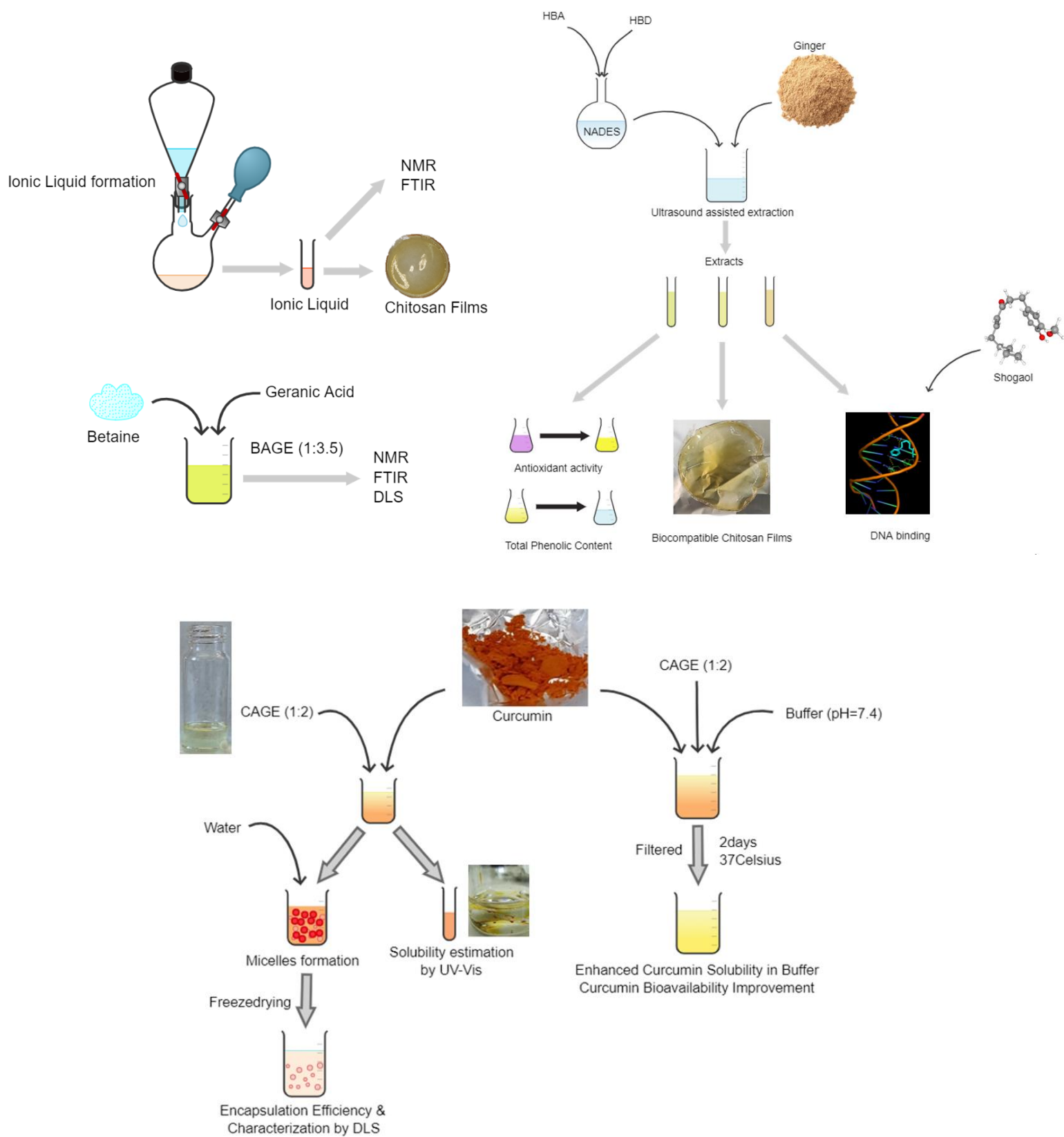
Το τζίντζερ είναι γνωστό μπαχαρικό με πληθώρα θεραπευτικών χρήσεων. Οι βιολογικές του δράσεις απορρέουν από τις –σε υψηλή περιεκτικότητα– αποθηκευμένες σε αυτό φαινολικές ενώσεις. Στο δεύτερο μέρος της εργασίας δίνεται προσοχή στην εκχύλιση κατά βάση ξηρού εμπορικού τζίντζερ με εκχυλιστικά μέσα φυσικούς βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες και υποβοηθούμενη από υπερήχους. Τα εκχυλίσματα αξιολογούνται ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση και το φαινολικό περιεχόμενο, ενώ ταυτόχρονα ενσωματώνονται ως ενισχυτικά σε βιοσυμβατά φιλμ χιτοζάνης για τη βελτίωση της βιοδραστικότητας και των μηχανικών τους ιδιοτήτων. Έπειτα, το βέλτιστο εκχύλισμα που προκύπτει από τις παραπάνω αξιολογήσεις είναι με διαλύτη Βεταΐνη:Γαλακτικό οξύ:Νερό σε αναλογία moles (1:2:2.5) και μελετάται η αλληλεπίδρασή του με το DNA θύμου αδένος μόσχου, από όπου προέκυψε πως πράγματι το εκχύλισμα αναπτύσσει αλληλεπίδραση με το DNA πιθανώς μέσω πρόσδεσης στη μεγάλη αύλακα.

Ίσως ο πιο καινοτόμος μελετούμενος διαλύτης να είναι το CAGE (1:2) χάρη στις ιδιότητές για διαδερμική μεταφορά και υψηλή διαλυτική ικανότητα φαρμακευτικών ουσιών και για την αντιμικροβιακή του δράση. Στο τρίτο, λοιπόν, μέρος της εργασίας αποδείχθηκε πως το CAGE (1:2) είναι εξαιρετικός διαλύτης ($>30\text{mg}_{\text{κουρκουμίνη}}/\text{g}_{\text{CAGE(1:2)}}$) της πρακτικά μη υδατοδιαλυτής κουρκουμίνης. Παράλληλα, ευρέθηκε πως η διαλυτότητα της κουρκουμίνης αυξάνεται (ως 1.5mg/mL) σε υδατικό μέσο παρουσία CAGE (1:2) (0.43mg/mL). Το συγκεκριμένο εύρημα αποδεικνύει πως είναι δυνατή η αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας της κουρκουμίνης

στον ανθρώπινο οργανισμό και η αξιοποίηση των θεραπευτικών της ιδιοτήτων. Ακόμα, το CAGE (1:2) έχει τη δυνατότητα σχηματισμού μικκυλίων σε υδατικό μέσο. Διαπιστώθηκε πως είναι δυνατός ο εγκλεισμός της κουρκουμίνης σε νανοσωματίδια CAGE (1:2) με μέγεθος της τάξης των 200nm για τις μελετούμενες αναλογίες της κουρκουμίνης ως προς τον φορέα. Τα νανοσωματίδια αυτά είναι σταθερά και συνάμα παρουσιάζουν ομοιογενή διασπορά σωματιδίων. Επιπλέον μελετήθηκαν και οι αποδόσεις εγκλεισμού που κυμαίνονται σε επίπεδα άνω του 85%. Επομένως, το CAGE (1:2) είναι πολλά υποσχόμενο για χρήση σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων. Ο χαρακτηρισμός των σωματιδίων έγινε με δυναμική σκέδαση φωτός, FT-IR και ο φορέας (CAGE(1:2)) αξιολογήθηκε ως προς την αντιοξειδωτική του δράση. Τέλος, χαρακτηρίστηκαν μέσω δυναμικής σκέδασης φωτός και σωματίδια BAGE (1:3.5) για τη μελέτη σχηματισμού μικκυλίων σε υδατικό μέσο, ως εναλλακτική του CAGE (1:2).

Λέξεις κλειδιά: πράσινη χημεία, ιοντικά υγρά, (φυσικοί) βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες, εκχύλιση με υπερήχους, πράσινη εκχύλιση, τζίντζερ, αντιοξειδωτική δράση, φαινολικό φορτίο, βιοσυμβατά φιλμ χιτοζάνης, DNA θύμου αδένος μόσχου, CAGE (1:2), BAGE (1:3.5), κουρκουμίνη, εγκλεισμός, νανοσωματίδια, μικκύλια

Graphical Abstract



Abstract

Without any doubt it is a sign of the times that governs the human thought to turn to a greener way of life in terms of sustainability. In this way the chemical industry is looking for new ways and means to design greener technologies and sustainable products. The present study moves within the fields of Green Chemistry and Engineering and, also, Pharmaceuticals, utilizing more environmentally and human friendly solvents for the green extraction of ginger and the inclusion and increase of bioavailability of curcumin for use in drug delivery systems.

Natural deep eutectic solvents and ionic liquids are two promising classes of green solvents with generally low toxicity, high biodegradability, wide variety of a large number of compounds in different combinations and wide range of applications. In the first part of the current work, such solvents are synthesized and characterized with emphasis given on CAGE (1:2) (choline:geranic acid). The characterization is done by ^1H NMR and FT-IR spectroscopy. BAGE solvent (1:3.5) (betaine:geranic acid) is synthesized for the first time in the literature. The ionic synthesized liquids are choline hydroxide with levulinic acid or vanillic acid or lauric acid in moles ratio (1:1), also CAGE (1:1) and (1:2). Ionic liquids, Choline hydroxide:levulinic acid and CAGE (1:2), are studied as chitosan film plasticizers. Among other things, natural deep eutectic solvents and ionic liquids are excellent extract media with high extraction capacity of bioactive compounds, acting as stabilizers and protectors.

Ginger is a well-known spice with a variety of therapeutic uses. Its biological actions are derived from the -in high quantities- phenolic compounds stored in it. In the second part of the study, attention is paid to the ultrasound assisted extraction mainly of dry commercial ginger with natural deep eutectic solvents as extraction agents. The extracts are evaluated for their antioxidant activity and total phenolic content, while at the same time they are incorporated as reinforcements in biocompatible chitosan films to improve their bioactivity and mechanical properties. Next, the optimal extract obtained from the above evaluations is with solvent Betaine: Lactic acid: Water in moles ratio (1:2:2.5) and its interaction with the thymus gland DNA is studied, from which it emerged that indeed the Extraction develops interaction with DNA possibly through binding to the large groove. Next, the optimal extract obtained from the above evaluations is considered the one with Betaine: Lactic acid: Water in moles ratio (1: 2: 2.5) as initial solvent and its interaction with the calf thymus DNA is studied, from which it emerged that indeed the extract develops interaction with DNA possibly through binding to the major groove.

Perhaps the most innovative solvent studied is CAGE (1:2) thanks to its non-invasive transdermal delivery properties and high solubilization of drugs and its antimicrobial activity. Therefore, in the third part of the study, it was proved that CAGE (1:2) is an excellent solvent ($>30\text{mg}_{\text{curcumin}}/\text{g}_{\text{CAGE (1:2)}}$) of practically water-insoluble curcumin. At the same time, it was found that the solubility of curcumin increases (up to 1.5mg/mL) in aqueous media in the presence of CAGE (1:2) (0.43mg/mL). This finding proves that it is possible to increase the

Abstract

bioavailability of curcumin in the human body and utilize its healing properties. Furthermore, CAGE (1:2) has the ability to form micelles in aqueous media. It was found that it is possible to encapsulate curcumin in CAGE (1:2) nanoparticles with a diameter magnitude of about 200nm for the studied curcumin contents. In addition, encapsulation efficiency is about 85%. These nanoparticles are at the same time stable and their dispersion is homogeneous. Therefore, CAGE (1:2) is very promising for use in drug delivery systems. The particles were characterized by dynamic light scattering, FT-IR and the nanocarrier (CAGE (1:2)) was evaluated for its antioxidant activity. Finally, BAGE (1:3.5) particles were characterized by dynamic light scattering for the study of micelle formation in aqueous medium, as an alternative to CAGE (1:2).

Keywords: green chemistry, ionic liquids, (natural) deep eutectic solvents, ultrasonic assisted extraction, green extraction, ginger, antioxidant activity, total phenolic content, biocompatible chitosan films, calf thymus DNA, CAGE (1:2), BAGE (1:3.5), curcumin, encapsulation, nanoparticles, micelles

Περιεχόμενα

1. Θεωρητικό Μέρος	1
Κεφάλαιο 1. Πράσινη Χημεία.....	1
Κεφάλαιο 2. Πράσινοι διαλύτες.....	5
2.1 Ιοντικά Υγρά (ΙΥ - Ionic Liquids).....	5
2.2 Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (Deep Eutectic Solvents-DESS).....	11
2.2.1 Βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες φυσικής προέλευσης (NADES).....	13
2.2.2 DES vs ΙΥ.....	15
2.3 Εφαρμογές.....	16
Κεφάλαιο 3. Διεργασίες εκχύλισης με χρήση πράσινων διαλυτών.....	17
3.1 Εκχύλιση.....	17
3.2 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (Ultrasound assisted extraction-UAE).....	18
3.3 Πράσινη εκχύλιση.....	19
3.4 Τζίντζερ και εκχύλιση.....	20
3.4.1 Τζίντζερ.....	20
3.4.2 Εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων του τζίντζερ.....	22
Κεφάλαιο 4. Αλληλεπίδραση DNA – προσδετών.....	23
4.1. Γενικά για το DNA και την αλληλεπίδραση με μικρά μόρια.....	23
4.2. Αλληλεπίδραση DNA και 6-τζιντζερόλης.....	25
Κεφάλαιο 5. Φιλμ Χιτοζάνης: Παρασκευή και χρήση.....	28
5.1 Χιτοζάνη.....	28
5.2 Βιομηχανικές εφαρμογές.....	29
5.3 Φιλμ Χιτοζάνης.....	30
5.4 Ο ρόλος των NADES στην τεχνολογία παρασκευής των φιλμ χιτοζάνης.....	31
Κεφάλαιο 6. Κουρκουμίνη.....	34
6.1 Δομικά χαρακτηριστικά.....	35
6.2 Μη βιοδιαθεσιμότητα κουρκουμίνης και δυσκολίες που ανακύπτουν.....	36
Κεφάλαιο 7. Νανοσυστήματα.....	39
7.1 Παραδείγματα νανοφορέων και κριτήρια επιλογής.....	41
Κεφάλαιο 8. Χολίνη:Γερανικό οξύ - CAGE (Choline And GERanate or Choline And GERanic acid).....	42
8.1 Λίγα λόγια για το CAGE 1:2.....	43
8.2 Δομικά χαρακτηριστικά – Ικανότητα σχηματισμού μικκυλίων.....	46
2. Πειραματικό Μέρος.....	49
Σκοπός Εργασίας.....	49
2.1 Όργανα και Υλικά.....	50
2.2 Σύνθεση Πράσινων Διαλυτών.....	52
2.2.1 Σύνθεση Ιοντικών Υγρών.....	52
2.2.2 Σύνθεση Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών Φυσικής Προέλευσης (NADESS).....	54
2.2.3 Σύνθεση CAGE.....	56
2.2.4 Σύνθεση BAGE – Βεταΐνης και Γερανικού.....	57
2.2.5 Δομικός χαρακτηρισμός των συντιθέμενων διαλυτών.....	58
2.3 Εκχύλιση Τζίντζερ με NADESS – Αλληλεπίδραση εκχυλισμάτων και σογκαόλης με ct-DNA – Ενισχυμένα με εκχύλισμα Φιλμ Χιτοζάνης.....	59
2.3.1 Εκχύλιση τζίντζερ με NADESS και υπερήχους.....	59
2.3.2 Χαρακτηρισμός Αντιοξειδωτικής Δράσης Εκχυλισμάτων – NADESS – CAGE 1:2.....	60
2.3.3 Προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών Εκχυλισμάτων (Total Phenolic Compound – TPC).....	63
2.3.4 Αλληλεπίδραση ct-DNA με σογκαόλη και εκχύλισμα τζίντζερ.....	64
2.3.5 Φιλμ χιτοζάνης ενισχυμένα με NADES και εκχύλισμα τζίντζερ.....	65
2.4 Μελέτη διαλυτότητας και εγκλεισμού κουρκουμίνης στο CAGE 1:2.....	68

2.4.1	Μελέτη διαλυτότητας κουρκουμίνης σε CAGE 1:2.....	68
2.4.2	Διάγραμμα διαλυτότητας φάσεων (Phase Solubility).....	69
2.4.3	Μελέτη εγκλεισμού της κουρκουμίνης στο CAGE 1:2.....	69
2.4.4	Χαρακτηρισμός σωματιδίων CAGE-κουρκουμίνης.....	70
3.	Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	72
3.1	Χαρακτηρισμός των συντιθέμενων διαλυτών.....	72
3.1.1.	Φασματοσκοπία πυρηνικού συντονισμού (¹ H NMR) και φασματοσκοπία υπέρυθρου (FT-IR) 72	
3.2	Χαρακτηρισμός εκχυλισμάτων.....	82
3.2.1	Αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων.....	82
3.2.2	Ολικό φαινολικό περιεχόμενο (Total Phenolic Content, TPC) των εκχυλισμάτων.....	88
3.2.3	Χαρακτηρισμός του εκχυλίσματος E/Bet:LA:W μέσω φασματοσκοπίας υπέρυθρου (FTIR-ATR) 91	
3.2.4	Χαρακτηρισμός φιλμ χιτοζάνης.....	94
3.2.5	Αλληλεπίδραση εκχυλίσματος E/Bet:LA:W με ct-DNA.....	103
3.3	Μελέτη διαλυτότητας κουρκουμίνης στο CAGE (1:2).....	108
3.3.1	Διαλυτότητα και Καμπύλη Αναφοράς.....	108
3.3.2	Μελέτη διαγράμματος φάσεων.....	110
3.4	Σχηματισμός μικκυλίων CAGE (1:2) και εγκλεισμός κουρκουμίνης εντός αυτών.....	113
3.4.1	Απόδοση διεργασίας και εγκλεισμού.....	114
3.4.2	Μέγεθος σωματιδίων, Δείκτης Πολυδιασποράς και Z-δυναμικό.....	115
3.4.3	Χαρακτηρισμός μέσω IR φασμάτων.....	118
4.	Συμπεράσματα.....	124
5.	Προτάσεις για το μέλλον.....	129
	Βιβλιογραφία.....	131
	Παράρτημα I.....	139
	Παράρτημα II.....	141
	Παράρτημα III.....	150

 Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1. Ευρετήριο συντομογραφιών.	_____	_____
Πίνακας 2. Γενικός τρόπος κατηγοριοποίησης DES. ^[26]	_____	12
Πίνακας 3. Πράσινη Εκχύλιση. ^[40]	_____	19
Πίνακας 4. Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν.	_____	50
Πίνακας 5. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν.	_____	51
Πίνακας 6. Η μοριακή αναλογία και οι συντακτικοί τύποι των ιόντων που αποτελούν τα συστατικά του ιοντικού υγρού υδροξυχολίνης και λεβουλινικού οξέος.	_____	52
Πίνακας 7. Η μοριακή αναλογία και οι συντακτικοί τύποι των ιόντων που αποτελούν τα συστατικά του ιοντικού υγρού υδροξυχολίνης και δωδεκανοϊκού οξέος.	_____	53
Πίνακας 8. Η μοριακή αναλογία και οι συντακτικοί τύποι των ιόντων που αποτελούν τα συστατικά του ιοντικού υγρού υδροξυχολίνης και βανιλικού οξέος.	_____	54
Πίνακας 9. Η μοριακή αναλογία και οι συντακτικοί τύποι του δέκτη και δότη δεσμών υδρογόνου του NADES Bet:LA (1:2).	_____	54
Πίνακας 10. Η μοριακή αναλογία και οι συντακτικοί τύποι του δέκτη και δότη δεσμών υδρογόνου του NADES Bet:Gly (1:3).	_____	55
Πίνακας 11. Η μοριακή αναλογία και οι συντακτικοί τύποι του δέκτη και δότη δεσμών υδρογόνου του NADES Glu:LA (1:5).	_____	56
Πίνακας 12. Συστατικά και θερμοκρασία παρασκευής των NADESs.	_____	56
Πίνακας 13. Διαλύτες για τους οποίους λήφθηκε ¹ H NMR.	_____	58
Πίνακας 14. Διαλύτες που μελετήθηκαν μέσω FT-IR.	_____	58
Πίνακας 15. Συνθήκες και πρώτες ύλες εκχύλισης.	_____	60
Πίνακας 16. Τρόπος πλήρωσης του plate με τα δείγματα.	_____	62
Πίνακας 17. Συνθήκες και αντιδραστήρια παρασκευής φιλμ χιτοζάνης.	_____	66
Πίνακας 18. Συγκεντρώσεις δειγμάτων σε κουρκουμίνη.	_____	69
Πίνακας 19. Τα αρχικά διαλύματα CAGE-κουρκουμίνης στα οποία προστέθηκε νερό και ύστερα, λυοφιλοποιήθηκαν και αποτελούν τη βάση για τη μελέτη του εγκλεισμού (encapsulation).	_____	70
Πίνακας 20. Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης και IC ₅₀ για τα εκχυλίσματα των διαφορετικών μορφών τζίντζερ.	_____	83
Πίνακας 21. Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης και IC ₅₀ για τα εκχυλίσματα του ξηρού τζίντζερ για τη μισή, μία και μιάμιση ώρα επώασης των δειγμάτων.	_____	85
Πίνακας 22. Αποτελέσματα ολικού φαινολικού φορτίου των εκχυλισμάτων διαφορετικών μορφών τζίντζερ.	_____	88
Πίνακας 23. Αποτελέσματα ολικού φαινολικού φορτίου των εκχυλισμάτων ξηρού τζίντζερ.	_____	89
Πίνακας 24. Αποτελέσματα βάρους φιλμ με ενίσχυση NADESs και εκχυλισμάτων αυτών.	_____	95
Πίνακας 25. Αποτελέσματα βάρους φιλμ ιοντικών υγρών.	_____	98
Πίνακας 26. Αποτελέσματα πάχους των φιλμ.	_____	99
Πίνακας 27. Αποτελέσματα διαπερατότητας υδρατμών και ποσοστού απώλειας νερού διαμέσου των φιλμ.	_____	99
Πίνακας 28. Αποτελέσματα αλληλεπίδρασης με το DNA	_____	107
Πίνακας 29. Αποδόσεις εγκλεισμού και διεργασίας για τα δείγματα εγκλεισμού της κουρκουμίνης	_____	114

Πίνακας 30. Διάμετρος, δείκτης πολυδιασποράς και ζ-δυναμικό για τα δείγματα εγκλεισμού μέσω
Δυναμικής Σκέδασης Φωτός. _____ 115

Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα 1. Το δέντρο της Πράσινης Χημείας όπως παρουσιάστηκε από τους P.T. Anastas et al. [3] 3	
Εικόνα 2. (a) Απρωτικό ΙΥ (υπάρχουν μόνο το ανιόν και το κατιόν και αλληλεπιδρούν με δυνάμεις Coulomb), (b) Ισχυρό πρωτικό ΙΥ (ολοκληρωμένη μεταφορά πρωτονίου, κυρίως δυνάμεις Coulomb), (c) Ασθενές πρωτικό ΙΥ (σχηματισμός επιπλέον δικτύου δεσμών υδρογόνου μεταξύ των ιόντων), (d) Διάλυμα πολύ ασθενούς πρωτικού ΙΥ (ουδέτερα είδη συμμετέχουν στο δίκτυο δεσμών υδρογόνου) [13]	8
Εικόνα 3. Τυπικοί NADESs. Οι πρώτες ύλες είναι: (1) σουκρόζη (Suc), (2) φρουκτόζη (Fru), (3) γλυκόζη (Glc) και (4) μηλικό οξύ (MA). Τα NaDES που παρασκευάζονται (5): Suc:Fru:Glc (1:1:1) και (6): Suc:MA (1:1). [23]	13
Εικόνα 4. Διάταξη probe υπερήχων. [39]	19
Εικόνα 5. Zingiber officinale Roscoe και το βρώσιμο ρίζωμά του. [50]	20
Εικόνα 6. Απεικόνιση τρόπων αλληλεπίδρασης DNA-προσδέτη. [56]	25
Εικόνα 7. Απεικόνιση της θέσης του προσδέτη σε κάθε είδος σύνδεσης με το DNA. [54]	25
Εικόνα 8. Δομική αναπαράσταση του συμπλόκου (a) AT-τζιντζερόλης και (b) GC-τζιντζερόλης. [55]	26
Εικόνα 9. Σχηματική αναπαράσταση των δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ ενός συστήματος (a) AT-τζιντζερόλης και (b) GC-τζιντζερόλης. [55]	26
Εικόνα 10. SEM εικόνες των (a) F / AA (οξικό οξύ), (b) F / Tween, (c) F / Bet: LA NADES, (d) F / ChCl: LA NADES, (e) F 0.5LA (f) F / Bet: LA mix. και (g) F / ChCl: μείγμα LA. Οι εικόνες στα αριστερά είναι σε $5 \cdot 10^3$ μεγέθυνση και στα δεξιά σε 10^4 μεγέθυνση. [69]	32
Εικόνα 11. Αριστερά το φυτό του κουρκουμά [41] και δεξιά οι δύο μορφές της κουρκουμίνης. [68] Σε όξινο και ουδέτερο pH επικρατεί η μορφή της δικετόνης.	34
Εικόνα 12. Προφίλ Απελευθέρωσης φαρμάκου. Επιδιώκεται παρατεταμένο χρονικό διάστημα απελευθέρωσης εντός του «θεραπευτικού παραθύρου». [87]	40
Εικόνα 13. Σχηματική αναπαράσταση της χρήσης CAGE στην κλινική καταπολέμηση των υπεύθυνων για τη ροδόχρους ακμή παθογόνων. [103]	45
Εικόνα 14. Οπτική διαφοροποίηση χρώματος CAGE με την προσθήκη 0, 17, 33, 67% κατ' όγκο νερό. [104]	47
Εικόνα 15. Σχηματική αναπαράσταση των δομών που λαμβάνει το CAGE ανάλογα με το ποσοστό νερού. Ξεκινάει από την απλή αναδιάταξη των υδρόφιλων και υδρόφοβων κομματιών, μετά περνά στη φάση σχηματισμού λαμέλων και καταλήγει στη δημιουργία μικκυλίων για νερό πάνω από 67% κατ' όγκο. [104]	47
Εικόνα 16. BAGE σε μοριακή αναλογία 1:3.5	57
Εικόνα 17. Τα εκχυλίσματα από αριστερά προς τα δεξιά: GT1, GT2, GT3, GT4, E / Bet: LA: W, E / EtOH: H ₂ O, E / Bet: Gly, E / Glu: LA: W, E / H ₂ O, E / EtOH	60
Εικόνα 18. IY ₂ (αριστερά) σε μορφή συμπαγούς κολλώδους στερεού και IY ₃ (δεξιά) ως πιο εύθρυπτο κοκκώδες στερεό.	75
Εικόνα 19. Υποκίτρινο διαυγές BAGE 1:3.5.	80
Εικόνα 20. Από αριστερά προς τα δεξιά: 1. Φιλμ χιτοζάνης F ₁ με οξικό οξύ, 2. Φιλμ χιτοζάνης F ₉ με 1% w/v εκχύλισμα E/Bet:LA:W, 3. Φιλμ χιτοζάνης F ₁₁ με 0.5% w/v E/Bet:Gly και οξικό οξύ.	96
Εικόνα 21. F ₁₄ μετά την Παρασκευή (αριστερά) και μετά την πάροδο 18 ημερών (δεξιά).	98

Εικόνα 22. Αριστερά: F ₁₅ Φιλμ CAGE (1:2) με προσθήκη οξικού οξέος μετά το CAGE. Δεξιά: F ₁₆ Φιλμ CAGE (1:2) με προσθήκη χιτοζάνης σε διάλυμα οξικού οξέος.....	98
Εικόνα 23. Υπέρκορα σε κourkeυμίνη υδατικά διαλύματα CAGE (1:2). Από αριστερά προς τα δεξιά: 0, 150, 300, 450, 600, 750, 900 ppm CAGE1: 2mL ρυθμιστικού διαλύματος. Η αύξηση της διαλυτότητας για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις CAGE(1:2) αποτυπώνεται οπτικά με βαθύτερο πορτοκαλί χρώμα.....	112
Εικόνα 24. Οπτική αναπαράσταση από αριστερά προς τα δεξιά: (1) Δείγμα <i>Micelles_Cage_cur/20</i> αμέσως μετά την προσθήκη νερού και πριν την έναρξη της ανάδευσης, (2) Τυφλό δείγμα <i>Micelles_Blank</i> μετά τη λυοφιλοποίηση, (3) Λυοφιλοποιημένο αραιό σε κourkeυμίνη δείγμα <i>Micelles_Cage_cur/5</i> και (4) Λυοφιλοποιημένο πυκνό σε κourkeυμίνη δείγμα <i>Micelles_Cage_cur/20</i>	114

Ευρετήριο σχημάτων

Σχήμα 1. Συνήθη ανιόντα και κατιόντα Ιοντικών Υγρών. ^[8]	6
Σχήμα 2. Εφαρμογές Ιοντικών Υγρών. ^[22]	10
Σχήμα 3. Εικονική αναπαράσταση της διαφοράς μεταξύ ενός ιδανικού ευτηκτικού μίγματος (κόκκινη γραμμή) και ενός βαθέως ευτηκτικού μίγματος (μπλε γραμμή). Το βαθέως ευτηκτικό μίγμα έχει μεγαλύτερη μείωση του σημείου τήξης από ότι ένα απλά ιδανικό ευτηκτικό μίγμα. ^[25]	12
Σχήμα 4. 6-Τζιντζερόλη. ^[51]	22
Σχήμα 5. Οι δομές της χιτίνης και της χιτοζάνης. ^[58]	28
Σχήμα 6. Τομείς εφαρμογής χιτοζάνη και παραγώγων αυτής. ^[67]	30
Σχήμα 7. Η κourkeυμίνη σε μορφή δικετόνης (αριστερά) και σε μορφή ενόλης (δεξιά).....	35
Σχήμα 8. Πιθανοί τρόποι αλληλεπίδρασης της κourkeυμίνης με ελεύθερες οξειδωτικές ρίζες και αναγέννησή της με ασκορβικό οξύ. ^[72]	36
Σχήμα 9. Χρήση της κourkeυμίνης σε διάφορες νευροεκφυλιστικές διαταραχές.....	38
Σχήμα 10. Παραδείγματα νανοφορέων.....	41
Σχήμα 11. Αξιοποίηση ΙΥ και DESs για τη δημιουργία συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων. ^[88] ..	42
Σχήμα 12. Αντίδραση σχηματισμού CAGE 1:2.....	43
Σχήμα 13. Αντίδραση σχηματισμού του CAGE 1:2.....	57
Σχήμα 14. Συγκριτικές τρισδιάστατες δομές της 6-σογκαόλης (αριστερά) και της 6-τζιντζερόλης (δεξιά).....	106

Ευρετήριο γραφημάτων και διαγραμμάτων

Γράφημα 1. Φάσμα ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) του ιοντικού υγρού IY_1	72
Γράφημα 2. Φάσμα IR του ιοντικού υγρού IY_1	74
Γράφημα 3. Φάσμα ^1H NMR (600MHz, DMSO-d_6) του ιοντικού υγρού CAGE (1:2).	76
Γράφημα 4. Φάσμα FTIR (αριστερά) για τη χολίνη (Choline Bicarbonate) και (δεξιά) για το γερανικό οξύ.....	78
Γράφημα 5. Φάσμα IR για το CAGE (1:2).	79
Γράφημα 6. Φάσμα ^1H NMR (600MHz, DMSO-d_6) του BAGE (1:3.5).	80
Γράφημα 7. Φάσμα IR για το BAGE (1:3.5).	81
Γράφημα 8. Φάσμα FTIR (ATR) για το Bet:LA (1:2).	92
Γράφημα 9. Φάσμα FTIR (ATR) για το εκχύλισμα E/Bet:LA:W	93
Γράφημα 10. Φάσμα FTIR (ATR) φιλμ F_2 ενισχυμένο με 1% w/v Bet:LA:W	101
Γράφημα 11. Φάσμα FTIR (ATR) φιλμ F_9 ενισχυμένο με εκχύλισμα 1% w/v E/Bet:LA:W	102
Γράφημα 12. Μία εκ των επιμέρους σαρώσεων DLS για το μέγεθος των σωματιδίων του δείγματος $\text{Micelles_Cage_cur}/20$. Φαίνεται πως τα σωματίδια εμφανίζουν μία άριστη ομοιομορφία.	116
Γράφημα 13. Φάσμα IR για την κουρκουμίνη.....	119
Γράφημα 14. Φάσμα IR για το Micelles_Blank που περιέχει μόνο το φορέα CAGE (1:2)	120
Γράφημα 15. Φάσμα IR για το $\text{Micelles_Cage_cur}/5$ με αρχική περιεκτικότητα σε κουρκουμίνη $5.45\text{mg}_{\text{κουρκουμίνη}}/\text{g}_{\text{CAGE1:2}}$	121
Γράφημα 16. Φάσμα IR για το $\text{Micelles_Cage_cur}/20$ με αρχική περιεκτικότητα σε κουρκουμίνη $20.33\text{mg}_{\text{κουρκουμίνη}}/\text{g}_{\text{CAGE1:2}}$	122
Γράφημα 17. Συγκριτική αναπαράσταση των φασμάτων IR των αρχικών συστατικών και των δειγμάτων.	123
Γράφημα 18. Φάσμα ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) του ιοντικού υγρού IY_2 (Δωδεκανοϊκό οξύ).	139
Γράφημα 19. Φάσμα ^1H NMR (600MHz, DMSO-d_6) του ιοντικού υγρού IY_3 (Βανιλικό οξύ).	139
Γράφημα 20. Φάσμα ^1H NMR (600MHz, DMSO-d_6) για το BAGE 1:3.	140
Γράφημα 21. Φάσμα IR του ιοντικού υγρού CAGE 1:1.	140
Γράφημα 22. Φάσμα FTIR (ATR) εκχυλίσματος E/Bet:LA:W	141
Γράφημα 23. Γράφημα 24. Φάσμα FTIR (ATR) εκχυλίσματος E/Glu:LA:W	141
Γράφημα 25. Φάσμα FTIR (ATR) εκχυλίσματος E/Bet:Gly	141
Γράφημα 26. Φάσμα FTIR (ATR) εκχυλίσματος $\text{E/EtOH:H}_2\text{O}$	142
Γράφημα 27. Φάσμα FTIR (ATR) εκχυλίσματος $\text{E/H}_2\text{O}$	142
Γράφημα 28. Φάσμα FTIR (ATR) εκχυλίσματος E/EtOH	142
Γράφημα 29. Φάσμα FTIR (ATR) φιλμ (F_1) με οξικό οξύ για διάλυση της χιτοζάνης.	143
Γράφημα 30. Φάσμα FTIR (ATR) φιλμ (F_2) ενισχυμένο με 1% w/v Bet:LA:W	143
Γράφημα 31. Φάσμα FTIR (ATR) φιλμ (F_3) ενισχυμένο με 3% w/v Bet:LA:W	143
Γράφημα 32. Φάσμα FTIR (ATR) φιλμ (F_6) ενισχυμένο με 0.5% w/v Bet:LA:W	144
Γράφημα 33. Φάσμα FTIR (ATR) φιλμ (F_7) ενισχυμένο με 3% w/v Bet:LA:W	144
Γράφημα 34. Φάσμα FTIR (ATR) φιλμ (F_8) ενισχυμένο με 0.5% w/v εκχύλισμα E/Bet:LA:W	145
Γράφημα 35. Φάσμα FTIR (ATR) φιλμ (F_9) ενισχυμένο με 1% w/v εκχύλισμα E/Bet:LA:W	145
Γράφημα 36. Φάσμα FTIR (ATR) φιλμ (F_{10}) ενισχυμένο με 1% w/v εκχύλισμα GT_1	145
Γράφημα 37. Φάσμα FTIR (ATR) φιλμ (F_{11}) ενισχυμένο με 0.5% w/v εκχύλισμα E/Bet:Gly	146

Ευρετήριο γραφημάτων και διαγραμμάτων

Γράφημα 38. Φάσμα FTIR (ATR) φιλμ (F ₁₂) ενισχυμένο με 0.5% w/v εκχύλισμα E/Glu:LA:W..	146
Γράφημα 39. Φάσμα FTIR (ATR) φιλμ (F ₁₃) ενισχυμένο με 1% w/v με το ιοντικό υγρό.....	146
Γράφημα 40. Φάσμα FTIR (ATR) φιλμ (F ₁₄) ενισχυμένο με 1% w/v με το ιοντικό υγρό.....	147
Γράφημα 41. Φάσμα FTIR (ATR) φιλμ (F ₁₅) ενισχυμένο με 1% w/v CAGE (1:2).....	147
Γράφημα 42. Φάσμα FTIR (ATR) εκχυλίσματος GT ₁	147
Γράφημα 43. Φάσμα FTIR (ATR) εκχυλίσματος GT ₂	148
Γράφημα 44. Φάσμα FTIR (ATR) εκχυλίσματος GT ₃	148
Γράφημα 45. Φάσμα FTIR (ATR) εκχυλίσματος GT ₄	148
Γράφημα 46. Φάσμα FTIR για το φρέσκο τζίντζερ.....	149
Γράφημα 47. Φάσμα FTIR για το ξηρό, θερμικά επεξεργασμένο, εμπορικό τζίντζερ.....	149
Γράφημα 48. Κατανομή μεγέθους σωματιδίων δείγματος (τυφλό) <i>Micelles_Blank</i> που περιέχει μόνο το φορέα CAGE (1:2).....	150
Γράφημα 49. Κατανομή μεγέθους σωματιδίων (αραιού σε κουρκουμίνη) δείγματος <i>Micelles_Cage_cur/5</i>	150
Γράφημα 50. Αποτελέσματα ζ-δυναμικού για το (τυφλό) δείγμα <i>Micelles_Blank</i> που περιέχει μόνο το φορέα CAGE (1:2).....	150
Γράφημα 51. Αποτελέσματα ζ-δυναμικού (αραιού) δείγματος <i>Micelles_Cage_cur/5</i>	151
Γράφημα 52. Αποτελέσματα ζ-δυναμικού για το (πυκνό) δείγμα <i>Micelles_Cage_cur/20</i>	151
Γράφημα 53. Κατανομή μεγέθους σωματιδίων BAGE (1:3.5).....	151
Γράφημα 54. Αποτελέσματα ζ-δυναμικού για το BAGE (1:3.5).....	152

Διάγραμμα 1. Φάσμα απορρόφησης του βαθέως ευτηκτικού διαλύτη (Bet:LA (1:2)) σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl με αυξανόμενη συγκέντρωση ct-DNA (0-400μM). Το βέλος δείχνει την αύξηση έντασης απορρόφησης (υπερχρωμία).....	104
Διάγραμμα 2. Φάσμα απορρόφησης του εκχυλίσματος E/Bet:LA:W (0.1μg/mL) σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (pH=7.4) με αυξανόμενη συγκέντρωση ct-DNA (0-400μM) με χρόνο επώασης 5 λεπτά στους 37°C. Το βέλος δείχνει την αύξηση έντασης απορρόφησης (υπερχρωμία).....	105
Διάγραμμα 3. Φάσμα απορρόφησης της σογκαόλης (0.01μg/mL) σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (pH=7.4) με αυξανόμενη συγκέντρωση ct-DNA (0-400μM) με χρόνο επώασης 5 λεπτά στους 37°C. Το βέλος δείχνει την αύξηση έντασης απορρόφησης (υπερχρωμία), ενώ αποτυπώνεται και η ερυθρή μετατόπιση.....	107
Διάγραμμα 4. Γραφική αναπαράσταση των συγκεντρώσεων κουρκουμίνης του CAGE (1:2) και της αποκρινόμενης απορρόφησης στο υπεριώδες-ορατό. Καμπύλη αναφοράς διαλυτότητας κουρκουμίνη σε CAGE (1:2).....	109
Διάγραμμα 5. Διάγραμμα διαλυτότητας σε mg/mL της κουρκουμίνης σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα με pH=7.4 για διαφορετικές περιεκτικότητες CAGE (1:2) σε gCAGE / mL ρυθμιστικού διαλύματος μετά από διήμερη επώαση στους 37°C.....	111
Διάγραμμα 6. Διάγραμμα διαλυτότητας σε mg/mL της κουρκουμίνης σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα με pH=7.4 για διαφορετικές συγκεντρώσεις CAGE (1:2) σε mmolCAGE / mL συνολικού διαλύματος μετά από διήμερη επώαση στους 37°C.....	111
Διάγραμμα 7. Μεταβολή μεγέθους νανοσωματιδίων συναρτήσει της αρχικής περιεκτικότητας κουρκουμίνης του δείγματος.....	117

Πίνακας 1. Ευρετήριο συντομογραφιών.

ΠΧ	Πράσινη Χημεία
ΠΟΥ	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
ΙΥ	Ιοντικό Υγρό
DES	Βαθέως ευτηκτικός διαλύτης (Deep Eutectic Solvent)
NADES	Φυσικός βαθέως ευτηκτικός διαλύτης (Natural Deep Eutectic Solvent)
CAGE ή CAGE (1:2)	Choline And GEranic acid (1:2) (Χολίνη και Γερανικό οξύ)
BAGE	Betaine And GEranic acid (Βεταΐνη και Γερανικό οξύ)
Bet	Βεταΐνη
LA	Γαλακτικό Οξύ
Gly	Γλυκερόλη
Glu	Γλυκόζη
IC₅₀	Συγκέντρωση για 50% αναστολή της ρίζας DPPH (Concentration for 50% inhibition)
DNA	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
Encapsulation	Εγκλεισμός
Micelles	Μικκύλια

1. Θεωρητικό Μέρος

Κεφάλαιο 1. Πράσινη Χημεία

Η Πράσινη Χημεία (Green Chemistry) αντιπροσωπεύει μία νέα και συνεχώς αναπτυσσόμενη προσέγγιση στη χημική έρευνα και το σχεδιασμό των χημικών διεργασιών. Η Πράσινη Χημεία (ΠΧ) προβάλλει ένα διαφορετικό τρόπο στο πώς πρέπει να λειτουργεί η χημεία και η χημική μηχανική βασιζόμενες στη βιωσιμότητα και την αειφορία. Συνίσταται δε στην εφαρμογή ενός συνόλου αρχών με στόχο τη μείωση ή εξάλειψη της χρήσης ή της παραγωγής επικίνδυνων ουσιών κατά το σχεδιασμό, την παραγωγή και τη χρήση των χημικών προϊόντων.^[1] Βασικός στόχος, δηλαδή, είναι η μείωση του κινδύνου που αφορά στο περιβάλλον, την ανθρώπινη υγεία και ασφάλεια που απορρέει από την παραγωγή και χρήση χημικών προϊόντων και επιτυγχάνεται με τον επανασχεδιασμό ή εξ' αρχής σχεδιασμό των τοξικών μορίων, της συνθετικής οδού και της βιομηχανικής διεργασίας παραγωγής.^[2]

Βασικός πυλώνας της Πράσινης Χημείας αποτελεί ο σχεδιασμός βιώσιμων προϊόντων και διεργασιών μέσω οργανωμένης, συστηματικής και καινοτόμου έρευνας. Ο σχεδιασμός οφείλει να υπάγεται στις 12 αρχές της Πράσινης Χημείας, οι οποίες εισήχθησαν από τους Paul Anastas και John Warner το 1998. Το πλαίσιο που καθορίζουν οι αρχές για το σχεδιασμό χημικών προϊόντων και διεργασιών αφορούν σε ολόκληρο τον κύκλο ζωής του προϊόντος: από τις πρώτες ύλες ως την αποδοτικότητα της διεργασίας, την ασφάλεια αυτής, την τοξικότητα και βιοαποικοδομησιμότητα των αντιδραστηρίων και των προϊόντων.

Οι 12 Αρχές^[1] συνοψίζονται ως εξής:

1. Προτιμότερη η πρόληψη δημιουργίας αποβλήτων παρά η εκ των υστέρων επεξεργασία τους.
2. Η συνθετική οδός σχεδιάζεται με στόχο τη μεγιστοποίηση της ενσωμάτωσης των πρώτων υλών στο τελικό προϊόν.
3. Όπου είναι εφικτό, οι συνθετικές οδοί πρέπει να χρησιμοποιούν ή να παράγουν χημικές ουσίες με μηδενική ή ελάχιστη τοξικότητα στην ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον.
4. Ο σχεδιασμός των προϊόντων οφείλει να στοχεύει στη διατήρηση της λειτουργικότητάς τους και στην ελάττωση της τοξικότητάς τους.
5. Χρήση ασφαλέστερων αντιδραστηρίων και διαλυτών.
6. Ενεργειακά αποδοτικός σχεδιασμός των χημικών διεργασιών για ελαχιστοποίηση οικονομικών και περιβαλλοντικών επιπτώσεων.
7. Ανανεώσιμες πρώτες ύλες.
8. Οι χημικές τροποποιήσεις θα πρέπει να ελαχιστοποιούνται.
9. Χρήση εκλεκτικών καταλυτών.
10. Ο σχεδιασμός χημικών προϊόντων είναι τέτοιος που στοχεύει στην αποικοδόμηση αυτών προς αβλαβή προϊόντα μετά τη χρήση τους, ώστε να μην παραμένουν στο περιβάλλον.
10. Ανάλυση ρύπων σε πραγματικό χρόνο για την αποφυγή δημιουργίας επικίνδυνων ουσιών.
12. Επιλογή ουσιών και διεργασιών (συνθήκες) με στόχο την αποφυγή ατυχημάτων.

Συμπεραίνεται, λοιπόν, πως το πεδίο εφαρμογής των αρχών της ΠΧ υπερβαίνει την καταστολή της τοξικότητας των χημικών ουσιών και περιλαμβάνει ως στόχο την εξοικονόμηση της ενέργειας, τη δημιουργία ασφαλέστερων συνθηκών σύνθεσης, τη μείωση της παραγωγής αποβλήτων και παραπροϊόντων και προβλέπουν την πορεία που οφείλει να ακολουθήσει το προϊόν από τη στιγμή της παραγωγής ως το τέλος του κύκλου ζωής του με την ανακύκλωση ή την τελική διάθεση και βιοαποικοδόμησή του.^[4]

Κάθε μία αρχή δε λειτουργεί ξεχωριστά από τις άλλες ούτε μεμονωμένα δίνει πράσινο χαρακτήρα σε μια διεργασία ή ένα προϊόν. Όλες μαζί δημιουργούν ένα ενιαίο εργαλείο στα χέρια του χημικού μηχανικού, έναν οδηγό που οφείλει να ακολουθήσει για να επιτύχει το σχεδιασμό μη τοξικών, βιοαποικοδομήσιμων, φιλικότερων προς το περιβάλλον και τον

άνθρωπο προϊόντων και διεργασιών περισσότερο αποδοτικών, βιώσιμων και ασφαλέστερων.

Οι αρχές παρουσιάζονται από τους P.T. Anastas et al. σαν τα 12 κλαδιά ενός δέντρου το οποίο πρέπει να προσαρμοστεί για να συμβιώσει μέσα στο δάσος (κοινωνία και περιβάλλον) χωρίς να αποβεί τοξικό για το υπόλοιπο οικοσύστημα. Το δέντρο της Πράσινης Χημείας (“Chemistree”) απεικονίζεται στην επόμενη εικόνα με τα φύλλα να αντιπροσωπεύουν τα εργαλεία και τους μηχανισμούς στους οποίους βασίζεται η εφαρμογή κάθε αρχής.^[3]



Εικόνα 1. Το δέντρο της Πράσινης Χημείας όπως παρουσιάστηκε από τους P.T. Anastas et al. ^[3]

Η ΠΧ είναι διεπιστημονικός κλάδος με ρίζες στη χημεία, τη χημική μηχανική, την τοξικολογία και την οικολογία.^[2] Η έννοια της ΠΧ δε θεσπίστηκε τα τελευταία χρόνια, αλλά αυτό που τη χαρακτηρίζει τα τελευταία χρόνια είναι το συνεχώς αναπτυσσόμενο ενδιαφέρον που εκφράζεται σε αυτήν.^[5] Η έρευνα επικεντρώνεται στη χρήση εναλλακτικών πρώτων υλών (μη τοξικών, ανανεώσιμων, βιοαποικοδομήσιμων) και καταλυτών, στη διερεύνηση αποτελεσματικότερων διαλυτών (πχ. βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες, ιοντικά υγρά), στο σχεδιασμό ασφαλέστερων διεργασιών και λιγότερο ενεργειακά απαιτητικών συνθηκών, στην εφαρμογή της βιοσύνθεσης, της βιομιμητικής και της σύνθεσης δίχως διαλύτες. Η ΠΧ βρίσκει ανταπόκριση σε χημικές βιομηχανίες, όπως φαρμάκων, καλλυντικών, αυτοκινήτων και γεωργίας.^[2]

Η ΠΧ τελείται κυρίως σε εργαστηριακή κλίμακα, ενώ τα αποτελέσματά της μπορούν να μεταφραστούν σε βιομηχανικό επίπεδο ως Πράσινη Μηχανική. Στόχος της Πράσινης Μηχανικής είναι ο σχεδιασμός, η χρήση διεργασιών και η εμπορευματοποίηση προϊόντων που να είναι οικονομικά συμφέροντα, να ελαχιστοποιούν τη ρύπανση που προκύπτει από τη χρήση τους και να μην ενέχουν κινδύνους για το περιβάλλον και τη δημόσια υγεία. Μια τέτοια ποσοτικοποίηση απαιτεί οργάνωση και παροχή πληροφοριών για τη χρήση του εκάστοτε προϊόντος καθ' όλο τον κύκλο ζωής το, ώστε να σχεδιαστεί ολιστικά η πορεία πράσινης σύνθεσης και χρήσης του.

Η υιοθέτηση πράσινων τεχνολογιών πρέπει να συμβαδίζει με την ευαισθητοποίηση του κοινού και την καταναλωτική συμπεριφορά καθώς οι καταναλωτές καθορίζουν την πορεία του προϊόντων μετά την παραγωγή του. Τέλος, οι κυβερνητικές αποφάσεις είναι αυτές που καθορίζουν το νομοθετικό πλαίσιο παρέχοντας τις κατευθυντήριες γραμμές για τη λειτουργία των βιομηχανιών.^[3]

Συμπερασματικά, η ΠΧ δεν αφορά μόνο την εργαστηριακή κλίμακα αλλά και την βιομηχανική μέσω του σχεδιασμού προϊόντων και διεργασιών και τους πολίτες που αποφασίζουν την πορεία του προϊόντος μετά τη χρήση του. Οι 12 αρχές συντελούν την συλλογιστική πορεία που οφείλει να ακολουθηθεί κατά το σχεδιασμό προϊόντων και διεργασιών. Τέλος, η οπτική της ΠΧ συνοψίζεται στο ρητό «benign by design» με τις 12 αρχές να καθοδηγούν στη βέλτιστη εφαρμογή του.^[2]

Κεφάλαιο 2. Πράσινοι διαλύτες

Στον εναλλακτικό συνθετικό σχεδιασμό το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στη συνθετική οδό που ακολουθείται στη σύνθεση του μορίου και όχι στο ίδιο το τελικό μόριο. Μία νέα συνθετική πορεία βασιζόμενη στις αρχές της ΠΧ μπορεί να οδηγήσει στο ίδιο τελικό προϊόν με παράλληλη μείωση ή εξάλειψη των τοξικών πρώτων υλών, παραπροϊόντων και αποβλήτων. Οι πρώτες ύλες και οι συνθήκες σύνθεσης αποτελούν τους κύριους παράγοντες που αν βελτιωθούν μπορεί να προκύψει μια βελτιωμένη συνθετική οδός. Η επιλογή του μέσου στο οποίο θα υλοποιηθεί η σύνθεση είναι καίριας σημασίας για τον «πράσινο» χαρακτήρα της. Στη χημεία το μέσο αποτελεί ο διαλύτης και πλέον υπάρχουν ποικίλοι εναλλακτικοί διαλύτες προς επιλογή.^[1]

Ανέκαθεν οι κυριότεροι διαλύτες που χρησιμοποιούνταν στη χημική βιομηχανία είναι οργανικοί, πετροχημικά παραγόμενοι διαλύτες. Οι οργανικοί διαλύτες έχουν συνδεθεί με πολλά οικονομικά, κοινωνικά και περιβαλλοντικά προβλήματα. Αρχικά, συνήθως είναι μη ανανεώσιμοι, δύσκολα βιοαποικοδομήσιμοι, τοξικοί για τον άνθρωπο και τα οικοσυστήματα, δαπανηροί και συμβάλουν στην εκπομπή πτητικών οργανικών ενώσεων. Η αναζήτηση νέων εναλλακτικών διαλυτών θα βοηθήσει στην εξοικονόμηση φυσικών και οικονομικών πόρων και στην ανάπτυξη φιλικότερων διεργασιών.

Στο κεφάλαιο αυτό γίνεται αναφορά σε δύο κατηγορίες ραγδαίως αναπτυσσόμενων εναλλακτικών διαλυτών, όπως τα ιοντικά υγρά και οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες καθώς και στα χαρακτηριστικά που τους προσδίδουν πιο πράσινους χαρακτήρα.

2.1 Ιοντικά Υγρά (IY - Ionic Liquids)

Η χρήση διαλυτών στη χημική βιομηχανία αποτελεί μεγάλο μέρος της ενεργειακής κατανάλωσης (60% στις φαρμακοβιομηχανίες) και η διαφυγή τους στην ατμόσφαιρα ή το έδαφος αποτελεί κύρια ρυπογόνο πηγή.^[6] Στην αντιμετώπιση αυτών των προβλημάτων, τα ιοντικά υγρά παρουσιάζουν εξέχουσες ιδιότητες.

Τα τήγματα αλάτων αποτελούν την πιο διευρυμένη έννοια και αντιπροσωπεύουν τις ιοντικές ενώσεις που βρίσκονται σε υγρή κατάσταση και συνεπώς, το σημείο τήξης τους είναι χαμηλότερο της θερμοκρασίας αποσύνθεσής τους. Με την ευρεία ανάπτυξη των ΙΥ είναι δυνατό πλέον να σημειωθεί ότι αποτελούν ένα ξεχωριστό ερευνητικό τομέα της χημείας.

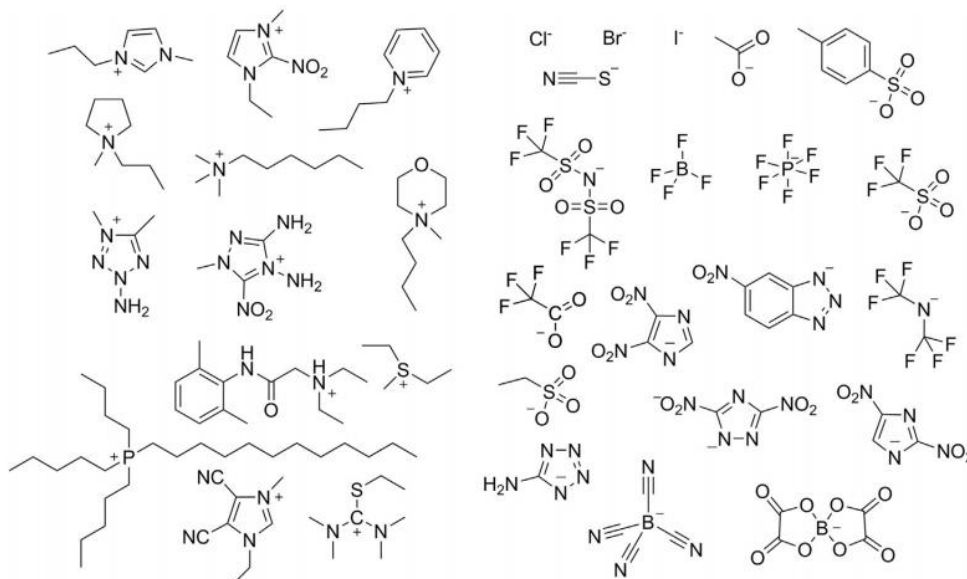
Ιοντικά Υγρά (IY) ονομάζονται οι ενώσεις που αποτελούνται αποκλειστικά από ιόντα και έχουν σημείο τήξης χαμηλότερο του σημείου βρασμού του νερού, δηλαδή κάτω των 100°C.^{[7] [8] [9]}

Τα ΙΥ αποτελούνται από οργανικά κατιόντα (συνήθως ογκώδη και ασύμμετρα) και οργανικά ή ανόργανα ανιόντα που συντελούν στη μείωση της ενέργειας πλέγματος ώστε να επιτυγχάνεται η υγρή φάση. Έτσι, τα ΙΥ μπορούν και παραμένουν υγρά σε θερμοκρασία δωματίου, αλλά ενίοτε και πολύ χαμηλότερα (έως -96°C).^[10] Επομένως, ανάλογα με το σημείο τήξης τους διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες:

ΙΥ θερμοκρασίας δωματίου

ΙΥ χαμηλού σημείου τήξης

Τήγματα αλάτων σε υψηλότερες θερμοκρασίες



Σχήμα 1. Συνήθη ανιόντα και κατιόντα Ιοντικών Υγρών.^[8]

Η ιστορία των ΙΥ έχει αρκετές διαφορετικές εκκινήσεις καθώς αποφαίνεται πως οι πρώτες μελέτες έγιναν χωρίς να υπάρχει γνώση των αντίστοιχων μελετών εκείνη την περίοδο. Το πρώτο ΙΥ (νιτρικό αιθυλαμμώνιο- $[\text{EtNH}_3][\text{NO}_3]$) αναφέρθηκε το 1888 από τους Gabriel και Weiner, ενώ το 1914 το $[\text{EtNH}_3][\text{NO}_3]$ αναφέρθηκε από τον Warner ως το πρώτο ΙΥ θερμοκρασίας δωματίου με σημείο τήξης τους 12°C και αποτελεί το πρώτο παράδειγμα Πρωτικού ΙΥ.^[11] Στο πέρασμα των ετών, η ύπαρξη και οι δυνατότητες των ΙΥ έμειναν στο παρασκήνιο με ελάχιστες έρευνες έως τη δεκαετία του 1980, όταν και εκδηλώθηκε μεγάλο ενδιαφέρον από ερευνητές όπως οι Seddon και Welton. Η θερμική σταθερότητα, η έλλειψη πτητικότητας

τας και οι φυσικές ιδιότητές τους οδήγησαν στην έρευνα των ΙΥ ως καταλύτες, ηλεκτρολύτες, λιπαντικά και ως μη υδατικοί βιοχημικοί διαλύτες με σταθερές ιδιότητες χάριν του δικτύου δεσμών υδρογόνου.^[11]

Με τη νέα χιλιετία, τα ΙΥ άρχισαν να αντιμετωπίζονται ως προτιμότεροι και πιο «πράσινοι» αντικαταστάτες των συμβατικών οργανικών διαλυτών, καθώς επιτυγχάνουν υψηλότερη αποδοτικότητα στην παραγωγή ενός μορίου, πχ ως διαλύτες ή/και ως καταλύτες) και είναι λιγότερο πτητικοί και εύφλεκτοι, ελαττώνοντας έτσι την εκπομπή αερίων του θερμοκηπίου και ενισχύοντας την ασφάλεια. Με την ανάπτυξη της Πράσινης Χημείας και τη σύμπραξη της χημείας, της χημικής μηχανικής, της επιστήμης των υλικών και της περιβαλλοντικής επιστήμης, τα ΙΥ αποτελούν πλέον έναν ελκυστικό και ραγδαίως εξελισσόμενο ερευνητικό τομέα με περισσότερες των 5000 ετήσιων δημοσιεύσεων.^[12]

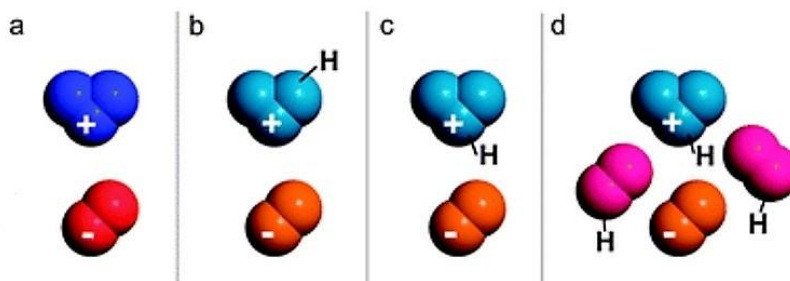
Τα ΙΥ θα μπορούσαν να κατηγοριοποιηθούν βάσει του κατιόντος που συμμετέχει ως εξής:^[6]

1. Με βάση το αλκυλαμμώνιο
2. Με βάση το διαλκυλιμιδαζόλιο
3. Με βάση το φωσφόριο
4. Με βάση το N-αλκυλοπυριδίνιο

Οι δύο βασικές κατηγορίες των ΙΥ είναι τα:

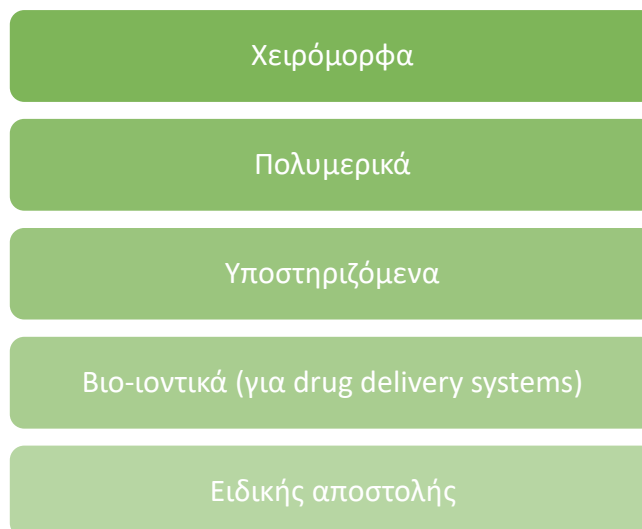
- Πρωτικά Ιοντικά Υγρά (ΠΙΥ)
- Απρωτικά Ιοντικά Υγρά (ΑΙΥ)

Τα ΠΙΥ προκύπτουν με μεταφορά πρωτονίου από ένα οξύ κατά Brønsted σε μία βάση κατά Brønsted. Τα ΑΙΥ δε διαθέτουν ευκίνητα πρωτόνια, η σύνθεσή τους απαιτεί πολλά στάδια και είναι δαπανηρή, το τελικό προϊόν δεν είναι καθαρό, συνήθως είναι τοξικά και όχι άμεσα βιοαποικοδομήσιμα. Αντιθέτως, τα ΠΙΥ είναι φθηνότερα, συντίθενται χωρίς παραγωγή παραπροϊόντων, ενώ είναι βιοαποικοδομήσιμα και έχουν υψηλή αγωγιμότητα. Παρ' όλα αυτά, τα ΠΙΥ έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν συχνά εκτεταμένο δίκτυο δεσμών υδρογόνου που ελαττώνει την ιοντικότητά τους σε σχέση με τα ΑΙΥ.^[6]



Εικόνα 2. (a) Απρωτικό ΙΥ (υπάρχουν μόνο το ανιόν και το κατιόν και αλληλεπιδρούν με δυνάμεις Coulomb), (b) Ισχυρό πρωτικό ΙΥ (ολοκληρωμένη μεταφορά πρωτονίου, κυρίως δυνάμεις Coulomb), (c) Ασθενές πρωτικό ΙΥ (σηματισμός επιπλέον δικτύου δεσμών υδρογόνου μεταξύ των ιόντων), (d) Διάλυμα πολύ ασθενούς πρωτικού ΙΥ (ουδέτερα είδη συμμετέχουν στο δίκτυο δεσμών υδρογόνου) [13]

Άλλες γνωστές κατηγοριοποιήσεις ΙΥ είναι οι εξής:



Η εκτεταμένη μελέτη έχει οδηγήσει σε βαθύτερη κατανόηση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων. Συνεπώς, τα ΙΥ πλέον δεν αναφέρονται αποκλειστικά ως μη πτητικά, μη εύφλεκτα και σταθερά στο νερό και στην ατμόσφαιρα, αλλά υπάρχουν ΙΥ που αναγνωρίζονται ως εμφανώς πτητικά, εύφλεκτα και ασταθή. Οι εκάστοτε ιδιότητες απορρέουν από τα ιόντα που τα αποτελούν και η λέξη που εκφράζει τα ΙΥ είναι η ποικιλία. Η ποικιλία στους συνδυασμούς ανιόντων-κατιόντων, στη μέθοδο παρασκευής και καθαρισμού παρέχει τη δυνατότητα επίτευξης των επιθυμητών ιδιοτήτων για κάθε εφαρμογή.

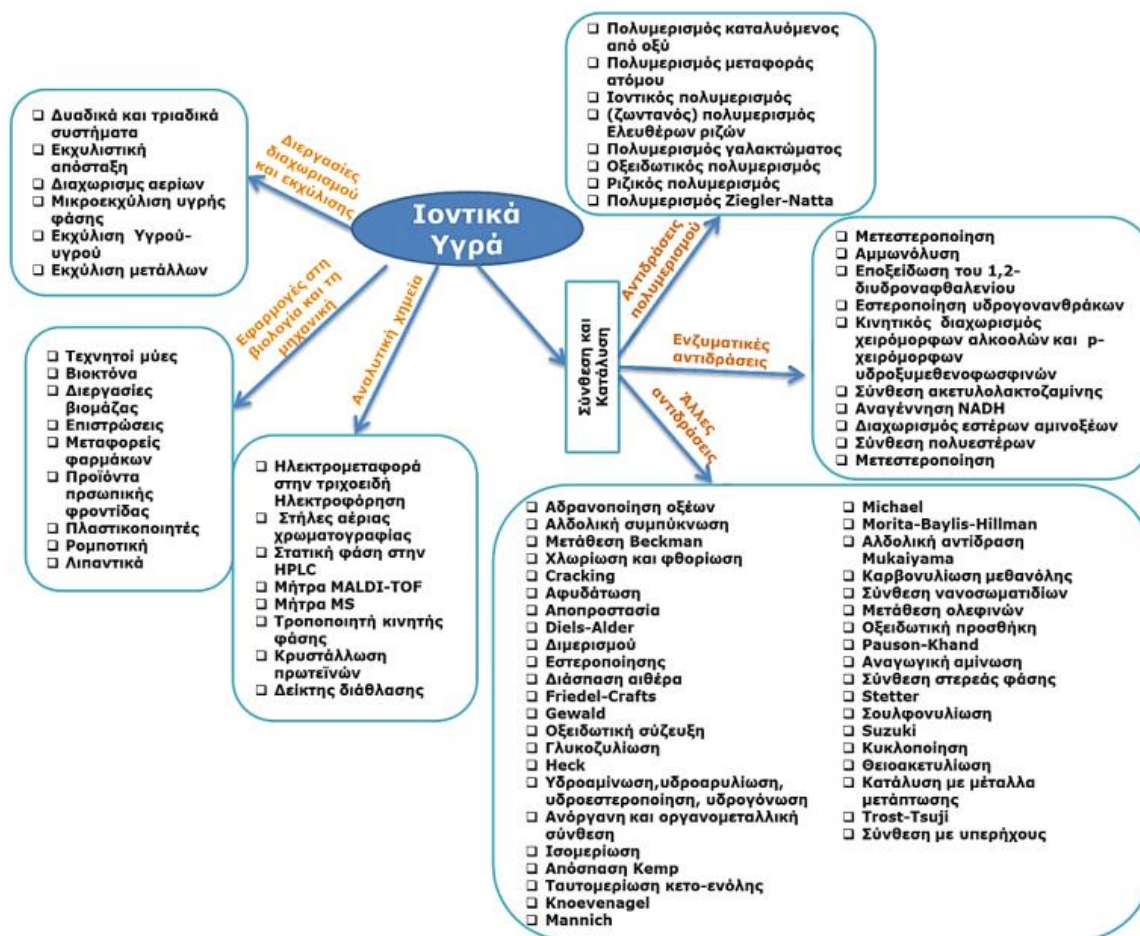
Οι ιδιότητες των ΙΥ προκύπτουν από τη δομή και τις αλληλεπιδράσεις των ιόντων. Οι αλληλεπιδράσεις αφορούν στο συνδυασμό δυνάμεων Coulomb, δεσμών υδρογόνου, π-π αλληλεπιδράσεων και δυνάμεων διασποράς. Οι δυνάμεις Coulomb απαντώνται σε όλα τα ΙΥ, ενώ η ύπαρξη των υπόλοιπων αλληλεπιδράσεων είναι αυτή που καθορίζει τις διαφορές στη συμπεριφορά τους. Για τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου θα πρέπει το κατιόν και το ανιόν να είναι ισχυρός δότης και δέκτης αντίστοιχα δεσμών υδρογόνου.[11]

Οι βασικές ιδιότητες των ΙΥ είναι το μεγάλο θερμοκρασιακό εύρος που βρίσκονται σε υγρή κατάσταση, η γενικά χαμηλή τάση ατμών στους 25°C, η θερμική και χημική σταθερότητα, η χαμηλή ευφλεκτότητα. Επίσης, τα ΙΥ είναι εκλεκτικοί και αποτελεσματικοί διαλύτες και πολυλειτουργικές ενώσεις. Γι' αυτό δύνανται να χρησιμοποιηθούν ως διαλύτες, καταλύτες, υποκαταστάτες, σταθεροποιητές.

Αντιδράσεις στις οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί ΙΥ είναι^[14]:

Diels-Alder
Heck
Aldol condensation
Suzuki-Miyaura coupling
Wittig
Stille
Friedel-Crafts
Hydrogenation
Reduction of aldehydes
Fluorination
Ring opening
Enzymatic

Τα ΙΥ χρησιμεύουν ως διαλύτες και καταλύτες σε αντιδράσεις Knoevenagel-Michael για τη σύνθεση υψηλής καθαρότητας δικουμαρινών^[15], καθώς και ως πρόσθετα για το διαχωρισμό αζεότροπων μιγμάτων, όπως των αιθανόλης-νερού.^{[16] [17]} Η τελευταία τους ιδιότητα μπορεί να αξιοποιηθεί για χρήση σε εκχύλιση με απόσταξη. Επίσης, τα ΙΥ δύνανται να αξιοποιηθούν ως βιοκαταλύτες^{[18] [19]} και ως μέσα σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις καταλυόμενες από μεταλλοπρωτεΐνες εντείνοντας της καταλυτική τους δράση.^[20] Τα πρωτικά ΙΥ είναι εξαιρετικά μέσα για τη σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου υψηλής σταθερότητας, χωρίς την απαίτηση προσθήκης επιπλέον σταθεροποιητικών και αναγωγικών παραγόντων ή ρύθμιση του pH.^[21] Στις παραπάνω εφαρμογές τα ΙΥ χαρακτηρίζονται από δυνατότητα ανακύκλωσης και επαναχρησιμοποίησης χωρίς σημαντική επίπτωση στην απόδοση των διεργασιών. Στο Σχήμα 2 δίνεται μία ευρύτερη αποτύπωση των δυνητικών εφαρμογών των ΙΥ.



Σχήμα 2. Εφαρμογές Ιοντικών Υγρών. [22]

Είναι όμως τα ΙΥ πράγματι «πράσινοι διαλύτες»;

Αρχικά, τα ΙΥ, έχουν χαρακτηριστεί σε πολυάριθμες αναφορές ως πράσινοι διαλύτες, αλλά η έννοια ενός «πράσινου» διαλύτη ενδεχομένως να είναι κάπως πλασματική και το πραγματικό ερώτημα να είναι κατά πόσο τα ΙΥ είναι ικανά να συμβάλλουν στη βιώσιμη παραγωγή και χρήση χημικών.

Αναντίρρητα, τα ΙΥ πρώτης γενιάς δε χαρακτηρίζονταν από σταθερότητα και πιθανώς ήταν τοξικά και μη βιοαποικοδομησιμα, ενώ με την πάροδο των ετών τα ΙΥ έχουν πλέον εξελιχθεί και χαρακτηρίζονται από φιλικότερο προς τον άνθρωπο και το περιβάλλον χαρακτήρα. Με την κατάλληλη επιλογή των αρχικών συστατικών-ιόντων, η σύνθεση ΙΥ νέας γενιάς στοχεύει στην ανακυκλωσιμότητα, την υψηλή βιοαποικοδομησιμότητα και τη χαμηλή τοξικότητα.

Η τοξικότητα και η βιοαποικοδομησιμότητα είναι στοιχεία που οφείλουν να εξεταστούν ώστε το εκάστοτε ΙΥ να χαρακτηριστεί «πράσινος διαλύτης». Γι' αυτό με τη συνδυαστική μέλτη τοξικότητας, βιοσυσσώρευσης και του μηχανισμού βιοαποικοδομησιμότητας των ΙΥ, αυτά μπορούν να αποτελέσουν εξαιρετικούς «πράσινους διαλύτες». Εργαλείο στη σύνθεση βιοαποικοδομήσιμων ΙΥ αποτελούν οι γενικές τάσεις που υπάρχουν στη βιβλιογραφία και εκφράζονται μέσω των κατά Boethling κανόνων, ενώ για την τοξικότητα εφαρμόζονται δοκιμές σύμφωνα με τον OECD.^{[23] [24]}

2.2 Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (Deep Eutectic Solvents-DESs)

Το σχετικά υψηλό κόστος και η ενδεχόμενη τοξικότητα ορισμένων ιοντικών υγρών οδήγησε στις αρχές του 21^{ου} αιώνα στη δημιουργία μιας νέας γενιάς διαλυτών, των βαθέως ευτηκτικών διαλυτών (DESs) οι οποίοι και διαθέτουν πολλά από τα επιθυμητά χαρακτηριστικά και ιδιότητες με τα ΙΥ. Η πρώτη αναφορά σε DES, έγινε από τον Abbott το 2001 κατά τον οποίο ο όρος αυτός περιέγραφε μίγματα αμιδίων με άλατα τεταρτοταγούς αμμωνίου με σημείο τήξης πολύ χαμηλότερο από εκείνα των καθαρών συστατικών τους, λόγω του σχηματισμού δικτύου δεσμών υδρογόνου μεταξύ ενός δότη δεσμού υδρογόνου (HBD) και ενός δέκτη υδρογόνου (HBA) σε συγκεκριμένη στοιχειομετρική αναλογία.^[33]

Παρότι έχουν παρέλθει αρκετά χρόνια από την εισαγωγή της έννοιας των DESs, χρειάζεται ακόμη βαθύτερη κατανόηση του συστήματος ώστε να δημιουργηθεί ένας ακριβής ορισμός που να μην δημιουργεί παρανοήσεις.

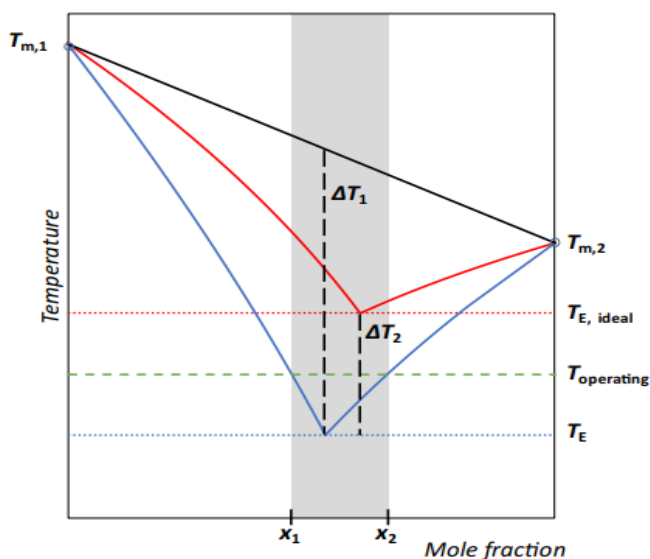
Ένας ακριβής ορισμός μπορεί να είναι ο εξής:

Βαθέως Ευτηκτικός Διαλύτης είναι ένα μίγμα το οποίο αποτελείται από δύο ή περισσότερα συστατικά, ένα δότη δεσμού υδρογόνου (Hydrogen Bond Donor-HBD) και ένα δέκτη δεσμού υδρογόνου (Hydrogen Bond Acceptor-HBA), οι οποίοι αλληλεπιδρούν δημιουργώντας μια ευτηκτική φάση με σημείο τήξης πολύ χαμηλότερο από αυτό κάθε συστατικού.^{[25] [26] [27] [29]}

Ο ορισμός αυτός δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται άρρηκτα. Αν και οι DESs θεωρούνται σύμπλοκα δεσμών υδρογόνου, η παρουσία δεσμών υδρογόνου μεταξύ δύο ενώσεων δεν είναι ικανή συνθήκη για να ορίσει ένα DES, καθώς και ένα ιδανικό μίγμα μεταξύ δύο ενώσεων μπορεί να εμφανίζει δίκτυο δεσμών υδρογόνου.^[25]

Έτσι, αυτό που κάνει ένα βαθέως ευτηκτικό διαλύτη «βαθύ» και τον ξεχωρίζει από τους υπόλοιπους ευτηκτικούς διαλύτες είναι πως η θερμοκρασία του ευτηκτικού σημείου είναι χα-

μηλότερη από εκείνη ενός ιδανικού μίγματος των συστατικών του.^[25] Γι' αυτό, ο προσδιορισμός «βαθέως» έχει προστεθεί συγκριτικά με άλλα ευτηκτικά μίγματα καθώς η απόκλιση του σημείου τήξης ενός DES από τα συστατικά του μπορεί να φτάνει και τους 100-200°C.



Σχήμα 3. Εικονική αναπαράσταση της διαφοράς μεταξύ ενός ιδανικού ευτηκτικού μίγματος (κόκκινη γραμμή) και ενός βαθέως ευτηκτικού μίγματος (μπλε γραμμή). Το βαθέως ευτηκτικό μίγμα έχει μεγαλύτερη μείωση του σημείου τήξης από ότι ένα απλά ιδανικό ευτηκτικό μίγμα.^[25]

Οι DESs μπορούν να περιγραφούν γενικά από τη φόρμουλα $Cat^+ X^- zY$, όπου Cat^+ είναι οποιοδήποτε κατιόν αμμωνιακού, φωσφορικού ή σουλφονικού άλατος, X μία κατά Lewis βάση και Y ένα κατά Lewis ή Brønsted οξύ.

Πίνακας 2. Γενικός τρόπος κατηγοριοποίησης DES.^[26]

Τύπος	Formula	
I	$Cat^+ X^- zMCl_x$	$M = Zn, Sn, Fe, Al, Ga, In$
II	$Cat^+ X^- zMCl_x \cdot yH_2O$	$M = Cr, Co, Cu, Ni, Fe$
III	$Cat^+ X^- zRZ$	$Z = CONH_2, COOH, OH$
IV	$MCl_x + RZ = MCl_{x-1}^+ \cdot RZ + MCl_{x+1}^-$	$M = Al, Zn$ $Z = CONH_2, OH$

Η ευτηκτική αναλογία για τους DESs δεν είναι μοναδική, αλλά αποτελεί ένα εύρος αναλογιών μεταξύ των αρχικών συστατικών στα όρια του οποίου αυτά αλληλεπιδρούν σχηματίζοντας ένα δίκτυο δεσμών υδρογόνου, το οποίο ευθύνεται για την ταπείνωση του σημείου τήξης σε σχέση με τις αρχικές ενώσεις.

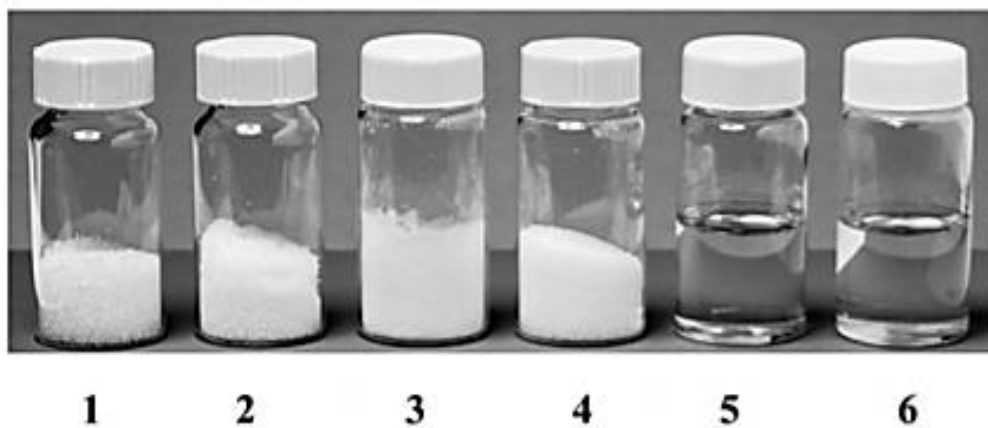
Στην ευτηκτική αναλογία το προκύπτουν μίγμα είναι υγρό διαυγές, σταθερό, μη πτητικό και ιξώδες ανάλογα με το ιξώδες των αρχικών ενώσεων. Η ταπείνωση του σημείου τήξης δίνει τη δυνατότητα να είναι ομογενή υγρά με υπερμοριακή δομή σε θερμοκρασία δωματίου.

Μεταξύ του X- και του Y εμφανίζονται περιστασιακά ηλεκτροστατικές δυνάμεις και δυνάμεις van der Waals, ενώ επικρατούν οι δεσμοί υδρογόνου που είναι, κυρίως, διαμοριακοί ανάμεσα στο δότη δεσμού και το αλογόνο.^[26]

Στους συμβατικούς διαλύτες το δίκτυο δεσμών υδρογόνου είναι ομοιογενές, ενώ στους DESs «πακετάρεται» έτσι ώστε να μεγιστοποιείται η δυναμική του δικτύου μεταξύ των ενώσεων. Έτσι, όλες οι δυνάμεις δημιουργούν ένα περίπλοκο δίκτυο αλληλεπίδρασης μεταξύ των ενώσεων, ενώ το κυρίαρχο πλέγμα δεσμών υδρογόνου προσδίδει τις ιδιότητες των DESs.

2.2.1 Βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες φυσικής προέλευσης (NADES)

Οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες αποτελούν υποομάδα των DESs και αφορούν στους DESs που σχηματίζονται από φυσικά συστατικά, όπως οργανικά οξέα και βάσεις, αμινοξέα, σάκχαρα, πολυαλκοόλες. Οι φυσικοί αυτοί πρωτογενείς μεταβολίτες κυττάρων, που αποτελούν πρώτη ύλη για NADES, υπάρχουν άφθονοι στη φύση, ανανεώνονται, είναι βιοαποικοδομήσιμοι και μη τοξικοί.



Εικόνα 3. Τυπικοί NADESs. Οι πρώτες ύλες είναι: (1) σουκρόζη (Suc), (2) φρουκτόζη (Fru), (3) γλυκόζη (Glc) και (4) μηλικό οξύ (MA). Τα NaDES που παρασκευάζονται (5): Suc:Fru:Glc (1:1:1) και (6): Suc:MA (1:1).^[23]

Το αυξανόμενο ενδιαφέρον για την εύρεση νέων υποψήφιων ενώσεων προς σχηματισμό ΙΥ και DESs και η χρήση σε νέες εφαρμογές οδήγησαν στη χρήση φυσικών προϊόντων ως αρχικών συστατικών. Τέτοια φυσικά συστατικά αποτελούν οι μεταβολίτες των κυττάρων. Δεν άργησα να γίνει πρόδηλο πως τέτοιες ενώσεις, όπως τα σάκχαρα, υπάρχουν σε αφθονία στα φυτά και ειδικότερα, σε περιόδους ξηρασίας ή παγετού. Έτσι, ανακαλύφθηκε ότι με την ανάμιξη των μεταβολιτών (στερεά φάση) φυτών προέκυψαν υγρά, τα NADESs. Επομένως, τα κομμάτια του παζλ ενώθηκαν και ανακαλύφθηκε ότι αυτά τα υγρά παίζουν σημαντικό ρόλο ως εναλλακτικό του νερού μέσο στους ζωντανούς οργανισμούς. Άλλωστε, εάν υπήρχαν μόνο δύο διαλύτες (νερό και λιπίδια) τότε το κύτταρο δε θα μπορούσε να διατελέσει την πληθώρα βιολογικών διεργασιών και κανένα φυτό δε θα επιβίωνε σε συνθήκες ξηρασίας ή πάγου. Σε τέτοιες περιόδους οι μεταβολίτες παράγονται σε περίσσεια σχηματίζοντας NADESs, οι οποίοι λειτουργούν ως αντικαταστάτες του νερού στην τέλεση σημαντικών ενδοκυτταρικών βιοχημικών αντιδράσεων και στη διαλυτοποίηση, αποθήκευση και μεταφορά μη υδατοδιαλυτών δευτερογενών μεταβολιτών εντός του κυττάρου και του οργανισμού.^[28]

Το δίκτυο δεσμών υδρογόνου του NADES συγκρατεί τα ελάχιστα -σε περιόδους ξηρασίας- μόρια νερού και η χαμηλή πτητικότητα αποτρέπει την εξάτμισή τους, ενώ σε περιόδους παγετού το χαμηλό ευτηκτικό σημείο αποτρέπει το κύτταρο να παγώσει.

Οι NADESs εμφανίζουν πολύ υψηλή ικανότητα διάλυσης βιοδραστικών μορίων, δρώντας παράλληλα ως προστατευτικά μέσα σταθεροποίησης αυτών χάρη στο δίκτυο δεσμών υδρογόνου.

Ανάλογα με τα συστατικά τους, μπορούν να χωριστούν σε πέντε κατηγορίες.

- Αποτελούμενα από ένα οξύ και μία βάση
- Ουδέτερα: αποτελούμενα μόνο από σάκχαρα ή σάκχαρα και πολυαλκοόλες
- Ουδέτερα DES με οξέα: αποτελούμενα από σάκχαρα/πολυαλκοόλες και οργανικά οξέα
- Ουδέτερα DES με βάσεις: αποτελούμενα από σάκχαρα/πολυαλκοόλες και οργανικές βάσεις
- Αποτελούμενα από αμινοξέα και οργανικά οξέα ή σάκχαρα

Συνοπτικά, οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες εμφανίζουν ποικίλα πλεονεκτήματα: χαμηλή τάση ατμών, χαμηλό κόστος, ευκολία παρασκευής, υψηλή βιοαποικοδομησιμότητα, σταθεροποιητικός ρόλος για τις βιοδραστικές ενώσεις, χαμηλή τοξικότητα, φυσικά προιόντα ως πρώτες ύλες και χρήση σε εφαρμογές τροφίμων και φαρμάκων.

2.2.2 DES vs IY

Αν και οι DESs εμφανίστηκαν σαν μία εναλλακτική για τη χρήση των IY, δε θα πρέπει να συγχέονται με τα IY καθώς αποτελούν δύο ξεχωριστές έννοιες. Οι DESs είναι μίγματα και όχι καθαρές ενώσεις όπως τα IY. Είναι συστήματα ενός οξέος κατά Lewis ή Brønsted και μίας βάσης που μπορεί να περιέχει ποικιλία ανιοντικών και κατιοντικών ειδών, ενώ τα IY σχηματίζονται από ένα διακριτό τύπο ανιόντος και κατιόντος.^[26] Η κυριότερη διαφορά, ίσως, είναι πως η σύνθεση των DESs δεν περιλαμβάνει κάποια χημική αντίδραση, αλλά οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό τους.

Γενικά, οι DESs εμφανίζουν όμοιες φυσικές ιδιότητες με τα IY καθώς η επιλογή των συστατικών τους μπορεί να γίνει ανάλογα με την εκάστοτε εφαρμογή. Σε γενικό πλαίσιο, εμφανίζουν χαμηλή τάση ατμών, μεγάλο θερμοκρασιακό εύρος υγρής κατάστασης, χαμηλή ευφλεκτότητα, σταθερότητα στον αέρα και την υγρασία και υψηλό, αλλά ρυθμιζόμενο, ιξώδες.

Οι DESs, όμως, υπερέχουν σε σύγκριση με τα IY. Οι αρχικές ενώσεις είναι συνήθως οικονομικές, άφθονες και υπάρχει η δυνατότητα αξιοποίησης μη τοξικών, ανανεώσιμων φυσικών πρώτων υλών. Η μέθοδος παραγωγής τους είναι απλή και περιλαμβάνει ανάμιξη των συστατικών και ήπια θέρμανση ή λυοφιλοποίηση και το τελικό προϊόν είναι απόλυτα καθαρό. Έτσι, το ενεργειακό κόστος και το κόστος παραγωγής διατηρούνται χαμηλά και παράλληλα με την απλότητα του εξοπλισμού η μεταφορά σε μεγάλη κλίμακα είναι βιώσιμη.^[26]

Η χρήση φυσικών πρώτων υλών δημιουργεί ένα λιγότερο τοξικό και εύκολα βιοαποικοδομήσιμο προϊόν. Αντίθετα, τα IY απαιτούν πιο σύνθετη παραγωγική πορεία, είναι πιο ακριβά και ορισμένα αποβαίνουν τοξικά.

Τέλος, οι NADESs είναι μίγματα που ενδεχομένως υπάρχουν στη φύση και είναι αποδεδειγμένο ότι έχουν αυξημένο διαλυτικό-εκχυλιστικό δυναμικό τόσο πολικών όσο και μη πολικών ενώσεων και δρουν σταθεροποιητικά για τα βιοδραστικά μόρια. Συνεπώς, θα μπορούσε να ειπωθεί ότι πράγματι οι NADESs αποτελούν μια πιο οικονομική, λιγότερο τοξική και πιο περιβαλλοντική εναλλακτική των IY.

2.3 Εφαρμογές

Οι DESs και οι NADESs βρίσκουν εφαρμογή σε ποικίλους τομείς. Κατ' αρχάς, χρησιμοποιούνται ως πράσινη εναλλακτική σε παραδοσιακές μεθόδους εκχύλισης για την εκχύλιση πολύτιμων προϊόντων από τα απόβλητα βιομηχανιών τροφίμων και από αγροτικά υποπροϊόντα χωρίς παράλληλη παραγωγή τοξικών αποβλήτων. [] Εφαρμόζονται, ακόμα, στη βιοκατάλυση και την ηλεκτροχημεία. Συγκεκριμένα, η υψηλή διαλυτότητα των μεταλλικών αλάτων σε μη υδατική διαλύματα και η υψηλή αγωγιμότητα των DESs τους κάνουν κατάλληλους στην έρευνα για την ηλεκτροαπόθεση μετάλλων.^{[27] [29]}

Η υπεροχή των NADESs στην βιοαποικοδομησιμότητα, στο κόστος παρασκευής σε σύγκριση με τα ΙΥ και η ικανότητα διάλυσης CO_2 έχουν ενισχύσει το ενδιαφέρον για εφαρμογή σε CCS (Carbon Capture) τεχνολογίες.^[31] Επίσης, οι NADESs είναι, κατά βάση, μη τοξικοί και έχουν υψηλή διαλυτική ικανότητα φαρμακευτικών ενώσεων που τους θέτει υποψηφιότητα για χρήση τους ως φορείς φαρμάκων (drug delivery).

Τέλος, η ικανότητα των DESs να δωρίζουν και να αποδέχονται πρωτόνια και ηλεκτρόνια συμμετέχοντας σε δεσμούς υδρογόνου αυξάνει τη διαλυτοποίηση ενώσεων ακόμα περισσότερο και γι' αυτό θεωρούνται εξαιρετικοί διαλύτες εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων.^[27]

Κεφάλαιο 3. Διεργασίες εκχύλισης με χρήση πράσινων διαλυτών

3.1 Εκχύλιση

Η εκχύλιση (extraction) είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική της οργανικής χημείας για την απομόνωση μίας ένωσης. Κατά τη διαδικασία της εκχύλισης η προς εκχύλιση ουσία μεταφέρεται από τη μία φάση στην οποία βρίσκεται στην άλλη (συνήθως αυτή του διαλύτη) με σκοπό να διαχωριστεί από την πρώτη ύλη και τις προσμίξεις αυτής.

Επίσης, χρησιμοποιείται ευρύτατα και στην περίπτωση απομόνωσης διαλυμένης ουσίας από έναν άλλο διαλύτη, όταν η διαδικασία αυτή δεν μπορεί να υλοποιηθεί με εξάτμιση του αρχικού διαλύτη.

Υπάρχουν τρεις τύποι εκχυλίσεων:

1. Στερεού-υγρού, με μεταφορά από τη στερεή φάση στην υγρή λόγω καλής διαλυτότητας του στερεού στο υγρό μέσο
2. Υγρού-υγρού
3. Χημική εκχύλιση

Η εκχύλιση είναι ίσως μία από τις πιο συχνά απαντώμενες διεργασίες στη χημική βιομηχανία και ειδικότερα, σε βιομηχανίες τροφίμων, φαρμάκων, καλλυντικών, με σκοπό την παραλαβή φυσικών βιοενεργών ενώσεων (πχ φλαβονοειδή, καροτενοειδή, ανθοκυανίνες) από φυσικές πρώτες ύλες (πχ φυτά, μύκητες, σπόρους).

Ο συχνότερος τρόπος εκχύλισης είναι η εκχύλιση ενώσεων από ξηραμένες φυτικές πρώτες ύλες χρησιμοποιώντας διαλύτες στους οποίους οι ενώσεις εμφανίζουν καλή διαλυτότητα. Οι τεχνολογίες εκχύλισης διακρίνονται στις συμβατικές και τις μη συμβατικές-προηγμένες.

Στις συμβατικές μεθόδους ανήκουν:

1. η διαβροχή
2. η εκχύλιση Soxhlet
3. η εκχύλιση με οργανικό διαλύτη
4. η υδροαπόσταξη

Οι συμβατικές μέθοδοι χαρακτηρίζονται από μεγάλο χρόνο εκχύλισης, υψηλό όγκο διαλυτών, χρήση θερμότητας για αύξηση της απόδοσης και γενικά, χαμηλή απόδοση λόγω διάσπασης θερμοευαίσθητων ενώσεων. Οι διαλύτες είναι, συνήθως, συμβατικοί οργανικοί, που σημαίνει ότι μπορεί να είναι επικίνδυνοι, τοξικοί, εύφλεκτοι, ενώ στην πλειοψηφία τους δεν ανακυκλώνονται. Το κόστος των συμβατικών μεθόδων είναι σαφώς υψηλότερων από των μη συμβατικών.

Στις προηγμένες μεθόδους^{[35] [36]} ανήκει η εκχύλιση:

1. υπό πίεση
2. με μικροκύματα
3. υποβοηθούμενη από υπερήχους
4. με υπερκρίσιμα ρευστά
5. με υποκρίσιμα ρευστά
6. υποβοηθούμενη ενζυμικά
7. ανακινούμενου δοχείου

Οι προηγμένες μέθοδοι απαιτούν πολύ μικρότερο χρόνο εκχύλισης, είναι πιο εκλεκτικές, δεν απαιτούν χρήση θερμότητας, άρα, είναι πιο οικονομικές και δεν καταστρέφουν τις θερμοευαίσθητες ενώσεις.

3.2 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (Ultrasound assisted extraction-UAE)

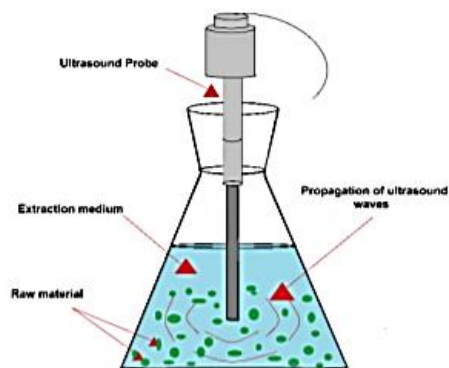
Η υπερηχητική εκχύλιση ή εκχύλιση με υπερήχους χρησιμοποιεί την ενέργεια των υπερηχητικών κυμάτων.^[37] Στη βιομηχανία υπάρχουν δύο συστήματα: ο καθετήρας (probe) και το λουτρό υπερήχων. Το probe υπερήχων είναι προτιμότερο καθώς η ένταση μεταδίδεται μέσω μικρής επιφάνειας και είναι πιο ισχυρό. Το probe λειτουργεί στα 20kHz και εμβαπτίζεται απευθείας στο προς εκχύλιση μίγμα, ελαττώνοντας, με αυτό τον τρόπο, την απώλεια ενέργειας και αυξάνοντας την απόδοση.^[34]

Μηχανισμός Εκχύλισης

Οι υπέρηχοι είναι τύπος ηχητικού κύματος ανάμεσα στα 20kHz με 100MHz. Όταν ο υπέρηχος διέρχεται από ένα μέσο προκαλεί τη συμπίεση και εκτόνωση αυτού. Ουσιαστικά, οι υπέρηχοι προκαλούν τη δόνηση του γειτνιαζόντος υγρού, το οποίο δονούμενο μεταφέρει την ενέργεια στα στερεά σωματίδια του μίγματος. Η δόνηση προκαλεί το φαινόμενο της σπηλαίωσης κατά το οποίο φυσαλίδες παράγονται, αυξάνονται σε μέγεθος και καταρρέουν.^{[34] [36] [37] [38]} Η κινητική ενέργεια λόγω δόνησης αξιοποιείται για τη θέρμανση του περιεχομένου της φυσαλίδας, οι οποίες δύνανται να φτάσουν τους 5000K, πίεση 1000atm και ρυθμό ψύξης άνω των $10^{10} \frac{K}{sec}$.^[38] Όταν η φυσαλίδα σκάσει, απελευθερώνεται μεγάλο ποσό ενέργειας προκαλώντας μικρορωγμές και διάρρηξη των κυττάρων. Πρακτικά δύο είναι τα φαινόμενα που λαμβάνουν μέρος^[38]:

1. Η διάχυση του διαλύτη κατά μήκος του κυτταρικού τοιχώματος
2. Η έκπλυση και διάλυση των ενώσεων του εσωτερικού του κυττάρου μετά τη διάσπασή του.

Διεργασίες εκχύλισης με χρήση πράσινων διαλυτών



Εικόνα 4. Διάταξη probe υπερήχων.^[39]

Η εκχύλιση με υπερήχους επιτυγχάνει χαμηλή κατανάλωση διαλύτη και ενέργειας, αύξηση της απόδοσης, μείωση του χρόνου και της θερμοκρασίας εκχύλισης και γι' αυτό ενδείκνυται για εκχύλιση θερμοευαίσθητων και ασταθών βιοενεργών ενώσεων. Βέβαια, απαιτείται σύστημα ψύξης, καθώς η προσφερόμενη από τους υπερήχους ενέργεια μετατρέπεται γρήγορα σε θερμότητα με κίνδυνο απότομης αύξησης της θερμοκρασίας.^{[34] [36] [37] [38]}

3.3 Πράσινη εκχύλιση

Η εκχύλιση φυσικών προϊόντων περιλαμβάνει εξαγωγή και ανάκτηση μεταβολιτών από τα φυτά. Το ενδιαφέρον εστιάζεται στην Πράσινη Εκχύλιση, στη χρήση τεχνικών με ελάχιστη ενεργειακή απαίτηση και υψηλή απόδοση και στη χρήση πράσινων διαλυτών.

Πίνακας 3. Πράσινη Εκχύλιση.^[40]

Αρχές Πράσινης Εκχύλισης Φυσικών Προϊόντων	
Αρχή 1 ^η	Καινοτομία στην επιλογή φυτικών ποικιλιών- Ανανεώσιμες φυτικές πρώτες ύλες
Αρχή 2 ^η	Χρήση «πράσινων διαλυτών
Αρχή 3 ^η	Μείωση ενεργειακής κατανάλωσης
Αρχή 4 ^η	Αξιοποίηση παραπροϊόντων αντί παραγωγής αποβλήτων
Αρχή 5 ^η	Μείωση του αριθμού των λειτουργικών μονάδων

Αρχή 6^η

Τελικό προϊόν φυσικό, βιοαποικοδομήσιμο και χωρίς προσμίξεις

Οι NADESs, χάρη στη δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου με τις ενώσεις που εκχυλίζουν, έχουν υψηλή διαλυτική ικανότητα βιοδραστικών ενώσεων.^[35]

Είναι κατάλληλοι διαλύτες για πράσινη εκχύλιση, αφού σαν φυσικά προϊόντα είναι μη τοξικοί, εκχυλίζουν πολικά και άπολα μόρια, ενώ δρουν προστατευτικά και σταθεροποιητικά προς τις ενώσεις. Ο συνδυασμός NADES με εκχύλιση με υπερήχους υπακούει στις αρχές της Πράσινης Εκχύλισης δημιουργώντας ένα αμιγώς «πράσινο» σύστημα.

3.4 Τζίντζερ και εκχύλιση

3.4.1 Τζίντζερ

Το *Zingiber officinale Roscoe* είναι ευρέως γνωστό ως τζίντζερ ή πιπερόριζα και ανήκει στην οικογένεια *Zingiberaceae* και το γένος *Zingiber*. Το *Zingiber officinale Roscoe* αποτελεί ένα πολυετές ριζωματώδες μονοκοτυλήδο φυτό που φτάνει τα 1.5 μέτρα ύψος. Προέρχεται από τη Νοτιοανατολική Ασία την Ινδία, από όπου και έχει εισαχθεί στα υπόλοιπα μέρη του κόσμου.^{[41][42] [43] [44]}



Εικόνα 5. *Zingiber officinale Roscoe* και το βρώσιμο ρίζωμά του.^[50]

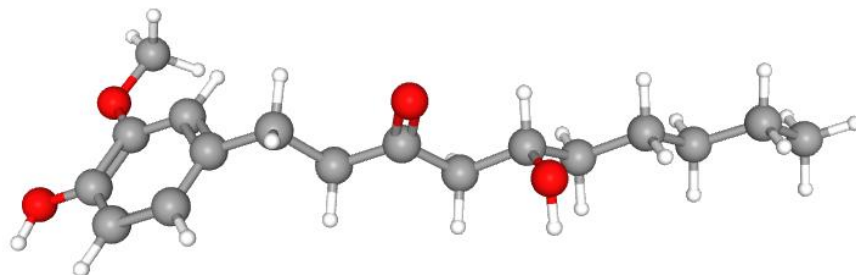
Το ρίζωμά του καλείται τζίντζερ, είναι βρώσιμο και το χρώμα του είναι λευκό, ενώ τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας μπορούν να έχουν κόκκινο έως καφέ χρώμα. Το τζίντζερ είναι από τα πιο γνωστά μπαχαρικά και χρησιμοποιείται ευρέως στη μαγειρική και τη φαρμακευτική. Από τα αρχαία χρόνια κιάλας γίνεται χρήση των εξαιρετικών του ιδιοτήτων στην Κινεζική και Ινδική ιατρική, ενώ φαίνεται να γίνεται αναφορά του σε κείμενα των Βεδικών το 4000πΧ.^[42] Οι θεραπευτικές του ιδιότητες είναι γνωστές από τον 9^ο αιώνα στην Ευρώπη

και από το 10^ο στην Αγγλία.^[43] Πλέον χρησιμοποιείται στην παραδοσιακή και σύγχρονη φαρμακευτική, περιλαμβάνεται στην βρετανική, κινεζική, ιαπωνική και ευρωπαϊκή φαρμακοποιία, ενώ ο ΠΟΥ (Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας) έχει εκδώσει μονογραφία που το κατατάσσει ως φαρμακευτικό βότανο.^[42] Η Ινδία είναι ο παγκόσμιος παραγωγός και ακολουθεί η Κίνα και στην Αφρική, η Νιγηρία.^[48] Κυκλοφορεί σε μορφή σκόνης, σιροπιού, αιθέριου ελαίου και ελαιορητίνης.

Είναι γνωστό για την αντιοξειδωτική, αντιμυκητησιακή, αντιφλεγμονώδη αντικαρκινική, αντιεμετική, αντιική, αντιοιδηματώδη, διουρητική, νευροπροστατευτική, αντιδιαβητική, αναλγητική, αντισπασμωδική, αντιρευματική του δράση. Το τζίντζερ έχει συνδεθεί με την καταπολέμηση πληθώρας ασθενειών. Ενδεικτικά χρησιμοποιείται σε συμπτώματα και ασθένειες όπως οι ρευματοπάθειες, ο βήχας, ο πυρετός, η καταρροή, οι μυϊκοί πόνοι, ο πονόδοντος, η ναυτία, ο εμετός, οι δερματικοί ερεθισμοί, η οστεοαρθρίτιδα, διάφορες πεπτικές διαταραχές, η βρογχίτιδα, καρδιακά και αναπνευστικά προβλήματα, νευροπάθειες και εκφυλίσεις των νεύρων, ο καρκίνος.^{[41][42] [43] [44] [45] [46] [47] [48]}

Η εκτεταμένη γκάμα χρήσεων του τζίντζερ οφείλεται στην πλούσια δεξαμενή βιοενεργών ουσιών που περιέχονται σε αυτό. Στο τζίντζερ έχουν εντοπιστεί περισσότερες των 400 διαφορετικών ενώσεων με τα κυριότερα συστατικά να αποτελούν οι υδατάνθρακες (50-70%), τα λιπίδια (3-8%), τα τερπένια και οι φαινολικές ενώσεις.^[43] Επιπλέον, παρόντα βρίσκονται αμινοξέα, φυτικές ίνες, πρωτεΐνες, βιταμίνες A-C, φυτοστερόλες και διάφορα μεταλλικά στοιχεία, καψαϊκίνη, τζιντζεροδιόλη, γαλανολακτόνη, τζιντζερ-γλυκολιπίδια, τζιντζερ-σουλφονικό οξύ. Τα τερπένια του τζιντζερ περιλαμβάνουν τα ζιγκιμπερένιο, β-δισαβολένιο, α-φαρνεζένιο, β-σεσκιφελλαδρένιο, α-κουρκουμένιο.^[48] Το τζίντζερ περιέχει έως και 3% αιθέριο έλαιο που οφείλει το άρωμά του στα σεσκιτερπενοειδή με κυριότερα τα δισαβολένια και το ζιγκιμπερένιο (30%). Η πικάντικη γεύση του οφείλεται στα φαινυλπροπανοειδή παράγωγα και συγκεκριμένα στις τζιντζερόλες, σογκαόλες, παραδόλες και τη τζιντζερόνη.^[48]

Οι φαινολικές ενώσεις που κυριαρχούν στο τζίντζερ είναι οι τζιντζερόλες (23-25%) και οι σογκαόλες (18-25%).^[43] Η 6-τζιντζερόλη και η 6-σογκαόλη (από την ιαπωνική λέξη shoga για το τζίντζερ) βρίσκονται σε αφθονία στο ρίζωμα (9.3 και 2.3mg/g αντίστοιχα), ενώ απαντώνται και οι 8- και 10-τζιντζερόλες σε αξιόλογες ποσότητες.^[42] Στο φρέσκο τζίντζερ επικρατούν οι τζιντζερόλες, ενώ στο ξηρό οι σογκαόλες, με βασική την 6-σογκαόλη, που είναι η αφυδατωμένη μορφή των αντίστοιχων τζιντζερολών και προκύπτουν κατά τη θερμική επεξεργασία ή μακρά αποθήκευσή του. Οι σογκαόλες χαρίζουν πιο έντονα πικάντικη γεύση.^[42]



Σχήμα 4. 6-Τζιντζερόλη.^[51]

Η αντιοξειδωτική ικανότητα αποδίδεται στις φαινολικές ενώσεις και στην παρουσία βιταμίνης C. Αν και οι ευεργετικές ιδιότητες του τζίντζερ είναι πολλαπλές, δεν υπάρχουν εκτεταμένες μελέτες για τη βιοδιαθεσιμότητα των συστατικών στους ανθρώπους, δηλαδή αν κατά την κατανάλωση τζίντζερ ο οργανισμός αξιοποιεί πραγματικά τις περιεχόμενες ενώσεις του.^[41]

3.4.2 Εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων του τζίντζερ

Η απομόνωση των χρήσιμων συστατικών του τζίντζερ γίνεται μέσω εκχύλισης. Ορισμένες τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση των βιοδραστικών ενώσεων του τζίντζερ είναι η εκχύλιση με αναρροή, με ανάδευση και με υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα. Όμως, λόγω του μεγάλου χρόνου ή/και όγκου οργανικών διαλυτών που απαιτούν δεν αποτελούν βιώσιμη επιλογή. Ως γνωστόν, το τζίντζερ περιέχει πολικές και μη πολικές πολυφαινόλες και γι' αυτό, η μελέτη της εκχύλισής του έχει χρησιμοποιήσει πολλούς διαφορετικούς διαλύτες.

Βέβαια, τα κύρια συστατικά, οι τζιντζερόλες και οι σογκαόλες, είναι μη πτητικές και μη πολικές ενώσεις, άρα, δεν αλληλεπιδρούν σημαντικά με πολικούς διαλύτες όπως το νερό. Επίσης, οι τζιντζερόλες είναι θερμικά ασταθείς, καθώς πάνω από τους 60°C μετατρέπονται σε σογκαόλες. Γι' αυτούς τους λόγους οι συμβατικές μέθοδοι που απαιτούν μεγάλο χρόνο και υψηλές θερμοκρασίες κρίνονται ακατάλληλες. Τα τελευταία χρόνια εφαρμόζονται προηγμένες μέθοδοι, όπως εκχύλιση υπό πίεση, με μικροκύματα και υπερήχους. Επιπλέον, είναι σημαντική η εύρεση άπολων διαλυτών, καθώς οι τζιντζερόλες και οι σογκαόλες δεν είναι σημαντικά υδατοδιαλυτές. Διαλύτες κατάλληλοι για να εκχυλίσουν πολικές και μη πολικές βιοενεργές ενώσεις που υπάρχουν στο τζίντζερ είναι οι DESs^[49] και ιδίως οι NADESs, οι οποίοι δρουν και ως προστατευτικοί και σταθεροποιητικοί φορείς των ενώσεων.

Κεφάλαιο 4. Αλληλεπίδραση DNA – προσδετών

4.1. Γενικά για το DNA και την αλληλεπίδραση με μικρά μόρια

Το DNA αποτελεί το γενετικό υλικό όλων των κυττάρων στο οποίο αποθηκεύεται, διατηρείται και μεταβιβάζεται η γενετική πληροφορία από κύτταρο σε κύτταρο και από οργανισμό σε οργανισμό. Το DNA είναι υπεύθυνο για την έκφραση των γενετικών πληροφοριών μέσω της διαδικασίας της μεταγραφής και σύνθεσης πρωτεϊνών (μετάφραση). Ουσιαστικά, το DNA είναι αυτό που ορίζει τη δημιουργία, τη σωστή λειτουργία και το θάνατο των κυττάρων.

Το δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) είναι μακρομόριο νουκλεοτιδίων. Κάθε νουκλεοτίδιο αποτελείται από μία πεντόζη, τη δεοξυριβόζη, ενωμένη με μία φωσφορική ομάδα και μία αζωτούχο βάση, που μπορεί να είναι αδενίνη (A), γουανίνη (G), κυτοσίνη (C) ή θυμίνη (T). Τα νουκλεοτίδια ενώνονται μεταξύ τους με ομοιοπολικό δεσμό, τον 3'-5' φωσφοδιεστερικό δεσμό σχηματίζοντας έναν υδρόφιλο σκελετό, την πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα. Το DNA αποτελείται από δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες, συμπληρωματική η μία προς την άλλη, σχηματίζοντας στο χώρο μία δεξιόστροφη διπλή έλικα. Στο εσωτερικό της βρίσκονται οι υδρόφοβες βάσεις κάθε αλυσίδας που συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου με τις βάσεις της απέναντι αλυσίδας -η αδενίνη με τη θυμίνη και η γουανίνη με την κυτοσίνη. Όταν το DNA έχει αποθηκευμένη λανθασμένη πληροφορία ή η διαδικασία της μετάφρασης δεν τελειώνει ορθά, το κύτταρο δεν λειτουργεί φυσιολογικά. Η μη σωστή λειτουργία του κυττάρου μπορεί να προξενήσει ασθένειες στον οργανισμό, όπως τα καρκινικά κύτταρα.

Έχει πλέον αποδειχθεί ότι μικρά οργανικά ή ανόργανα μόρια έχουν την ικανότητα να προσδέονται στο μόριο του DNA και να επηρεάζουν τις βιολογικές του δράσεις, όπως η αντιγραφή και η μεταγραφή. Οι δράσεις αυτές ξεκινούν όταν δοθεί από τη ρυθμιστική πρωτεΐνη το κατάλληλο σήμα στο DNA. Έτσι, αντί να προσδεθεί η πρωτεΐνη -για παράδειγμα το ένζυμο RNA πολυμεράση στους υποκινητές για τη διαδικασία της μεταγραφής- και να ξεκινήσει η διεργασία του κυττάρου, προσδέονται άλλα μικρά μόρια παρεμποδίζοντας ή εντατικοποιώντας τη διεργασία.^[52] Συνήθως τέτοιες ουσίες είναι οι φαρμακευτικές. Αυτή η αλληλεπίδραση DNA-φαρμάκου μπορεί να καθυστερήσει, να εμποδίσει την ανάπτυξη του κυττάρου ή να οδηγήσει σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό του. Το σημαντικό είναι ότι στην περίπτωση με φυσιολογικών κυττάρων, όπως τα καρκινικά, η χρήση τέτοιων ειδικών φαρμάκων μπορεί να καταστείλει την αντιγραφή ή και μεταγραφή της λανθασμένης γενετικής πληροφορίας και να οδηγήσει στο θάνατό τους.

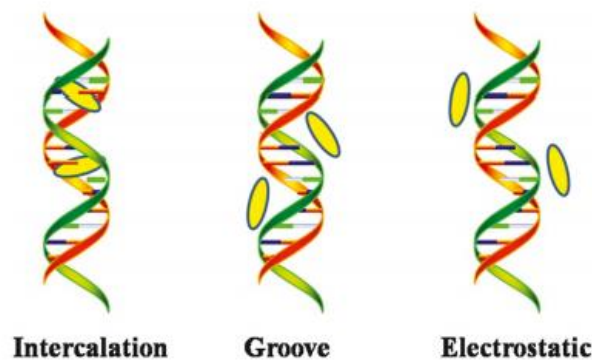
Τα μέρη του DNA που δύνανται να αλληλεπιδράσουν με τέτοιες μικρές ενώσεις είναι ο αρνητικά φορτισμένος σκελετός που έχει δημιουργηθεί από τις φωσφορικές ομάδες μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων, οι βάσεις στη μικρή και μεγάλη αύλακα μέσω δεσμών υδρογόνου, τα οξυγόνα της φωσφορικής ομάδας και τα υδρόφοβα αρωματικά συστατικά μέσω δυνάμεων van der Waals.^[52] Η αλληλεπίδραση DNA-φαρμάκου μπορεί να πραγματοποιηθεί

είτε με ομοιοπολικούς δεσμούς που είναι μη αντιστρεπτοί, προκαλούν ολική παρεμπόδιση των λειτουργιών το DNA και οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο, είτε με την προτιμότερη μη ομοιοπολική σύνδεση που είναι αντιστρεπτή και επηρεάζει τη διαμόρφωση, τη στρέψη του DNA, την αλληλεπίδρασή του με τις πρωτεΐνες και ενδεχομένως, οδηγεί σε σπάσιμο της αλυσίδας.^[52]

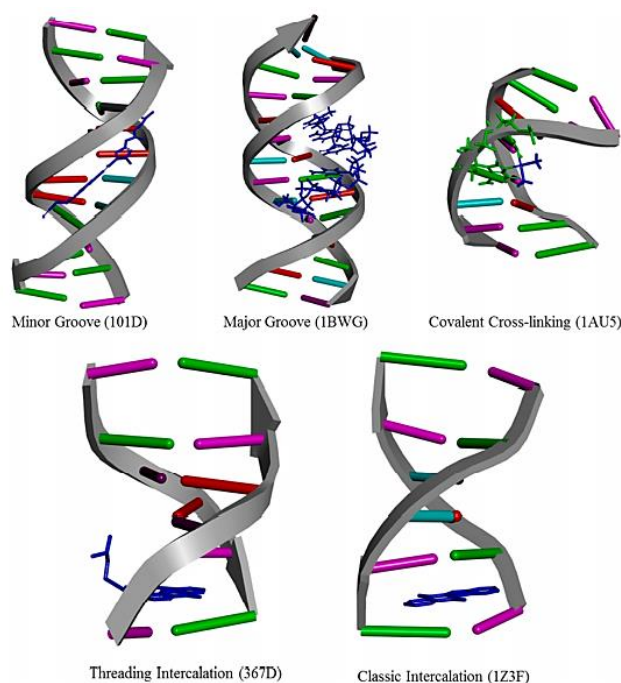
Οι παράγοντες που αλληλεπιδρούν μη ομοιοπολικά με το DNA κατηγοριοποιούνται ως:



Οι παρεμβολείς προσδένονται κάθετα στο σκελετό του DNA και το σύμπλοκο που δημιουργείται σταθεροποιείται μέσω δεσμών υδρογόνου, δυνάμεων van der Waals, μεταφοράς φορτίου και υδροφοβικές τάσεις. Οι παρεμβολείς σταθεροποιούν, επιμηκύνουν, σκληραίνουν και ξετυλίγουν τη διπλή έλικα στο σημείο πρόσδεσης. Οι προσδέτες της μικρής αύλακας έχουν συνήθως ημικυκλικό σχήμα και σταθεροποιούνται ως σύμπλοκο με το DNA μέσω van der Waals αλληλεπιδράσεων. Στο σημείο του συμπλόκου μία βάση περιστρέφεται προς τον προσδέτη σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου που δρουν σταθεροποιητικά. Έτσι, στο σημείο του συμπλόκου η συστροφή της διπλής έλικας έχει αντιστραφεί σε σχέση με την υπόλοιπη διπλή έλικα. Οι προσδέτες της μεγάλης αύλακας διαθέτουν θετικό ηλεκτροστατικό δυναμικό που ελκύεται από το αρνητικό της αλυσίδας και είναι λιγότερο συχνό από τους προσδέτες της μικρής αύλακας. Τέλος, οι εξωτερικοί προσδέτες αλληλεπιδρούν ηλεκτροστατικά με τις φωσφορικές ομάδες των αλυσίδων του DNA.^{[52] [53]}



Εικόνα 6. Απεικόνιση τρόπων αλληλεπίδρασης DNA-προσδέτη.^[56]

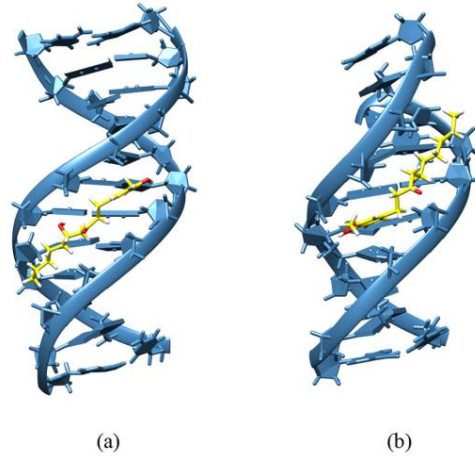


Εικόνα 7. Απεικόνιση της θέσης του προσδέτη σε κάθε είδος σύνδεσης με το DNA.^[54]

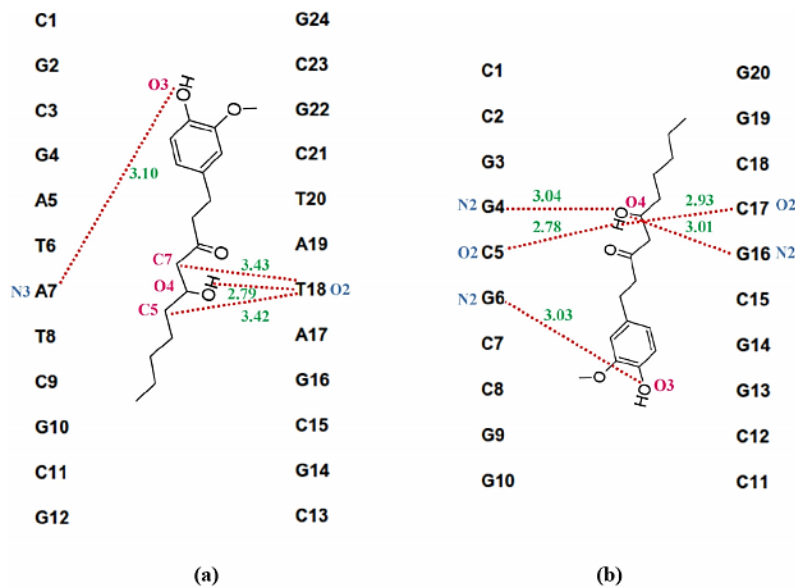
4.2. Αλληλεπίδραση DNA και 6-τζιντζερόλης

Το τζιντζερ περιέχει πολλά υποσχόμενες ενώσεις που δύνανται να λειτουργήσουν ως φάρμακα αλληλεπιδρώντας με το DNA. Μία από αυτές είναι η κυρίαρχη στο ρίζωμα, 6-τζιντζερόλη. Έχει μελετηθεί η αλληλεπίδραση του DNA βοδινού θύμου με την 6-τζιντζερόλη σε διάφορες συγκεντρώσεις DNA και ένωσης. Αυτό που ανέκυψε είναι πως η 6-τζιντζερόλη

εμφανίζει μη ομοιοπολική σύνδεση με το DNA. Μάλιστα ανήκει στην κατηγορία των προσδετών της μικρής αύλακας. Η σύνδεση της 6-τζιντζερόλης με στο DNA γίνεται 1:1 και η αντίδραση δέσμευσης (συμπλοκοποίηση) είναι ενδόθερμη και αυθόρμητη.^[55]



Εικόνα 8. Δομική αναπαράσταση του συμπλόκου (a) AT-τζιντζερόλης και (b) GC-τζιντζερόλης.^[55]



Εικόνα 9. Σχηματική αναπαράσταση των δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ ενός συστήματος (a) AT-τζιντζερόλης και (b) GC-τζιντζερόλης.^[55]

Η 6-τζιντζερόλη προσδέεται στη μικρή αύλακα χωρίς σημαντική προτίμηση στην αλληλουχία του DNA, δηλαδή αν είναι πλούσια σε βάσεις A-T ή G-C. Η σύνδεση πραγματοποιείται με δεσμούς υδρογόνου και δυνάμεις van der Waals προκαλώντας μικρή ελάττωση στην κινητικότητα του DNA στο σημείο δημιουργίας του συμπλόκου, ενώ η αλληλεπίδραση δεν επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τη θερμοκρασία στο εύρος 25-40°C.^[55] Συνεπώς, από όλα αυτά θα μπορούσε να διατυπωθεί ένα ενδιαφέρον σχετικά με το εκχύλισμα του τζιντζερ και

Αλληλεπίδραση DNA – προσδετών

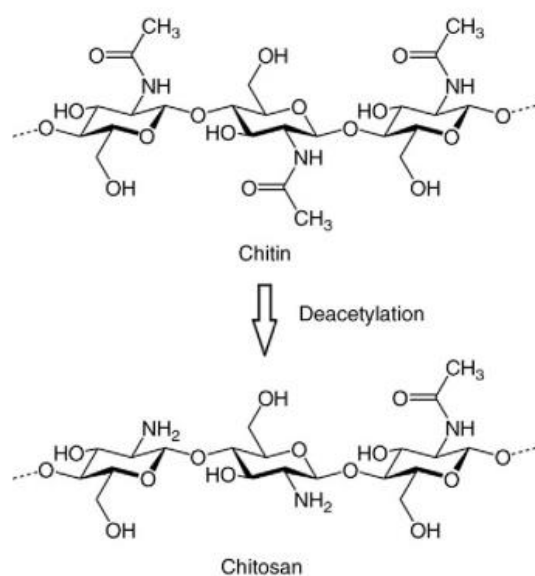
τη λειτουργία του ως φάρμακο στην καταπολέμηση ασθενειών και μη φυσιολογικών κυττάρων-στόχων.

Κεφάλαιο 5. Φιλμ Χιτοζάνης: Παρασκευή και χρήση

5.1 Χιτοζάνη

Η χιτίνη είναι ο δεύτερος πιο συχνά απαντώμενος στη φύση πολυσακχαρίτης μετά την κυτταρίνη και αποτελείται από μόρια N-ακετυλογλυκοζαμίνης ενωμένα με β -1,4 γλυκοζιτικό δεσμό. Η χιτίνη βρίσκεται στον εξωσκελετό και στην εσωτερική δομή ασπόνδυλων.^{[57] [61]} Μάλιστα δρα ως δομικό στοιχείο σε κατώτερους οργανισμούς, όπως μύκητες, βρίσκεται σε βακτηριακά κυτταρικά τοιχώματα και είναι άφθονη (20-50%) στα κελύφη οστρακοειδών-καρκινοειδών.^[58]

Η χιτοζάνη είναι γραμμικό πολυμερές της χιτίνης αποτελούμενο από τυχαία καταναμημένα μόρια D-γλυκοζαμίνης και N-ακετυλογλυκοζαμίνης συνδεδεμένα με β -1,4 γλυκοζιτικό δεσμό. Ουσιαστικά, η χιτοζάνη παράγεται από την αποακετυλίωση των μορίων της χιτίνης, ειδικότερα σε βαθμό άνω του 50% και ανάλογα με το βαθμό αποακετυλίωσης (DD) αποτελεί συμπολυμερές γλυκοζαμίνης και N-ακετυλογλυκοζαμίνης.^[57]



Σχήμα 5. Οι δομές της χιτίνης και της χιτοζάνης.^[58]

Αν και οι περισσότεροι φυσικοί πολυσακχαρίτες είναι ουδέτεροι και όξινοι, η χιτοζάνη είναι βασικός πολυσακχαρίτης που εμφανίζεται ως ημικρυσταλλικό πολυμερές σε στερεή κατάσταση. Είναι πρακτικά αδιάλυτη στο νερό και σε οργανικούς διαλύτες, ενώ διαλύεται σε όξινα μέσα, δηλαδή σε αραιά υδατικά διαλύματα οξέων όπως το οξικό οξύ. Η διαλυτοποίηση πραγματοποιείται μέσω της πρωτονίωσης της $-NH_2$ ομάδας του C_2 της D-γλυκοζαμίνης. Μάλιστα η παρουσία της αμινομάδας κάνει τη χιτοζάνη πιο ευέλικτη-versatile σε σχέση με τη χιτίνη. Η διαλυτότητα εξαρτάται από το βαθμό αποακετυλίωσης, το pH, τη φύση του οξέος, την κατανομή των ακετυλοομάδων, τις συνθήκες απομόνωσης της χιτοζάνης και τη

συγκέντρωση του οξέος, καθώς σε υψηλές συγκεντρώσεις εμφανίζεται το φαινόμενο της εξαλάτωσης όπου η διαλυτότητα μειώνεται.^{[57] [60]}

Η χιτοζάνη είναι άφθονο και ανανεώσιμο φυσικό πολυμερές με εξαιρετικές ιδιότητες. Είναι βιοσυμβατή, βιοαποικοδομήσιμη, μη τοξική και έχει αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή, αντιμυκητιασική και πιθανώς αντικαρκινική δράση.^[57]

Η χιτίνη παράγεται ως απόβλητο των βιομηχανιών όστρακων και η ανάκτησή της ως χιτοζάνη με παράλληλη ανάκτηση καροτενοειδών αποτελεί εφικτή οικονομική επιλογή. Τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί το ενδιαφέρον στην αξιοποίηση της χιτοζάνης από τα απόβλητα βιομηχανιών χάρη στη μη τοξικότητα, βιοαποδομησιμότητα και βιοσυμβατότητα, ιδιότητες που συμβαδίζουν με τις αρχές της Πράσινης Χημείας.

5.2 Βιομηχανικές εφαρμογές

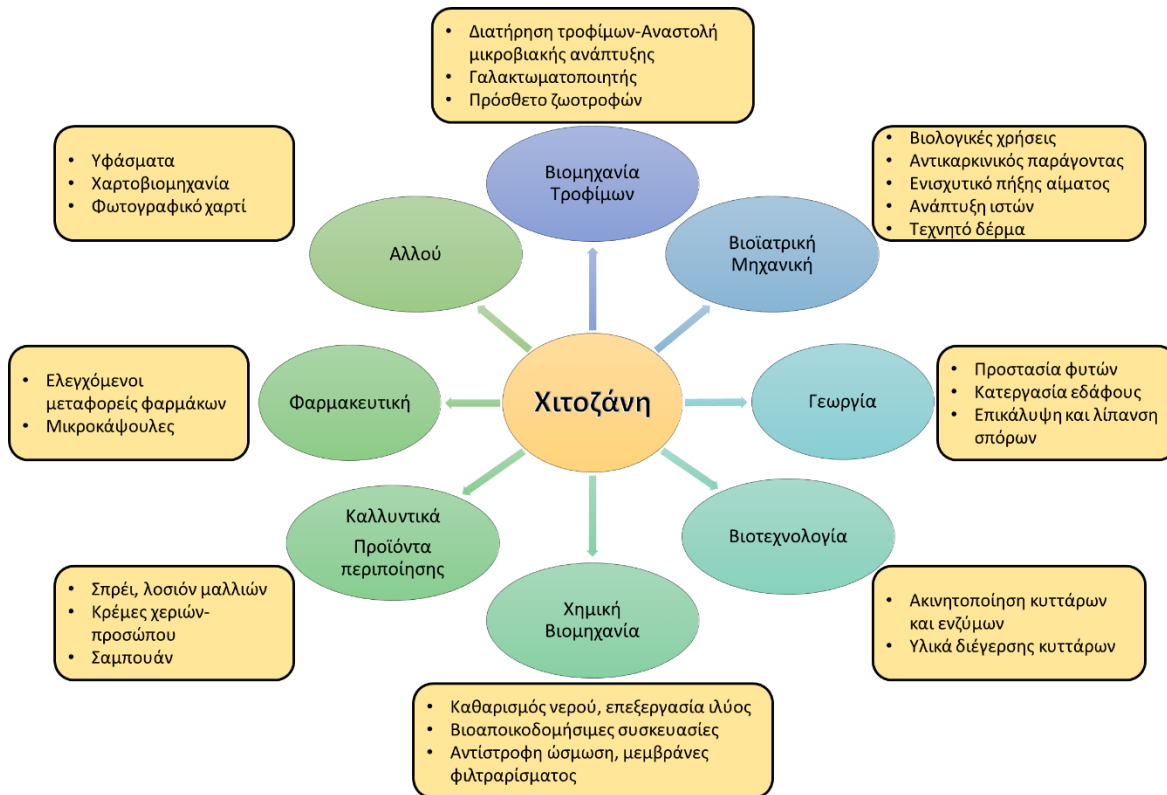
Οι φυσικοχημικές ιδιότητες της χιτοζάνης την κάνουν κατάλληλη για εφαρμογή στη φαρμακευτική, τη βιομηχανία τροφίμων και χημικών, την κοσμητολογία και τη βιοϊατρική.

Η χιτοζάνη είναι κατάλληλη για την περιποίηση μαλλιών, δέρματος, στόματος. Αυτό συμβαίνει γιατί η χιτοζάνη διαθέτει θετικό ηλεκτρικό φορτίο που συμπληρώνει το αρνητικό της τρίχας δημιουργώντας ένα αόρατο ελαστικό φιλμ που λειαίνει, μαλακώνει και ενδυναμώνει τα μαλλιά. Επίσης, λειτουργεί ως ενυδατικό του δέρματος και προλαμβάνει το σχηματισμό πλάκας και τερηδόνας στα δόντια. Έτσι, χρησιμοποιείται σε σαμπουάν, κρέμες και οδοντόπαστες.^[57]

Χάρη στην πολυκατιονική φύση της, η χιτοζάνη λειτουργεί ως κροκιδωτικός παράγοντας και παράλληλα απομακρύνει πετρελαιοπαραγώγα και δεσμεύει τα βαρέα μέταλλα ως εναλλακτική των σύνθετων ρητίνων. Γι' αυτούς τους λόγους αξιοποιείται στην επεξεργασία αποβλήτων. Ακόμα, η χιτοζάνη δύναται να ενισχύσει τις μηχανικές ιδιότητες του ανακυκλωμένου χαρτιού, ενώ μειώνει την προσρόφηση υγρασίας και το καθιστά αμεσότερα βιοαποδομήσιμο. Στη γεωργία η επεξεργασία των σπόρων με χιτοζάνη αυξάνει την ανάπτυξη και καταπολεμά τους παθογόνους μικροοργανισμούς και το σάπισμα των ριζών.^{[57] [67]}

Το πιο λαμπρό μέλλον για τη χιτοζάνη ίσως να βρίσκεται στη βιομηχανία τροφίμων, όπου μπορεί να αποτελέσει περιβαλλοντική εναλλακτική για βιοενεργές συσκευασίες που επεκτείνουν το χρόνο ζωής των τροφίμων και οι ίδιες μπορούν να είναι εδώδιμες ή να βιοαποδομούνται.

Άλλες εφαρμογές περιλαμβάνουν τη χρήση στη βιοϊατρική ως επουλωτικοί επίδεσμοι, φορείς φαρμάκων, εμφυτεύματα, ιδανικοί φακοί επαφής και ως τεχνητό δέρμα. Παρουσιάζεται η εκτεταμένη χρήση της χιτοζάνης στην επόμενη εικόνα.



Σχήμα 6. Τομείς εφαρμογής χιτοζάνης και παραγώγων αυτής.^[67]

5.3 Φιλμ Χιτοζάνης

Η χιτοζάνη μπορεί να σχηματίσει φιλμ με καλές φυσικές ιδιότητες, αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση και ελεγχόμενη ροή O_2 και CO_2 . Οι παράγοντες που επηρεάζουν τις φυσικές και λειτουργικές ιδιότητες των φιλμ χιτοζάνης είναι ο βαθμός αποακετυλίωσης της χιτοζάνης, το μοριακό βάρος της, το είδος, η συγκέντρωση και η εξάτμιση των όξινων υδατικών διαλυμάτων που διαλύεται η χιτοζάνη, η χρήση πλαστικοποιητών και οι συνθήκες (θερμοκρασία ξήρανσης, pH) κατά την παρασκευή τους.^{[58] [60]} Τα φιλμ χιτοζάνης αποτελούν υποσχόμενη εναλλακτική στη συσκευασία τροφίμων και θα πρέπει να επιδεικνύουν ικανοποιητικές μηχανικές ιδιότητες και επιλεκτική διαπερατότητα αερίων.

Τα φιλμ χιτοζάνης παρουσιάζουν καλές μηχανικές ιδιότητες και συγκεκριμένα, επιμήκυνση θραύσης και αντοχή σε εφελκυσμό. Η αντοχή σε εφελκυσμό είναι ανάλογη του βαθμού αποακετυλίωσης και του μοριακού βάρους. Όσο αυξάνεται ο βαθμός αποακετυλίωσης τόσο

πιο πυκνά «πακετάρονται» οι πολυμερικές αλυσίδες, με υποκαταστάτες μικρές αμινομάδες, δημιουργώντας ισχυρότερες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αλυσίδων και, άρα, αυξάνεται η εφελκυστική αντοχή. Αντίθετα, η αύξηση του βαθμού αποακετυλίωσης μειώνει την ικανότητα επιμήκυνσης του φιλμ και την απορρόφηση υγρασίας. Επίσης, αύξηση του μοριακού βάρους συνεπάγεται αύξηση του μήκους του σχηματιζόμενου δικτύου με συνεπαγόμενη αύξηση της εφελκυστικής αντοχής, της ικανότητας επιμήκυνσης και της απορρόφησης υγρασίας. Η θερμοκρασία ξήρανσης και η σχετική υγρασία επηρεάζουν τις μηχανικές ιδιότητες, ενώ γενικά μπορεί να παρατηρηθεί αύξηση της αντοχής σε εφελκυσμό με το χρόνο λόγω της σταδιακής μεταβολής στη διαμόρφωση των μορίων χιτοζάνης και τη μείωση του ελεύθερου όγκου του πολυμερούς που απαρτίζει το φιλμ.^{[58] [59]}

Εκτός από τις σημαντικές μηχανικές ιδιότητες, σπουδαίο ρόλο έχει η διαπερατότητα των φιλμ στα διάφορα αέρια. Η επιλεκτική διαπερατότητα O_2 , CO_2 και N_2 μπορεί να δημιουργήσει συνθήκες ελεγχόμενης ατμόσφαιρας για μεγαλύτερο κύκλο ζωής των τροφίμων. Έτσι, η χαμηλή διαπερατότητα σε O_2 στοχεύει στην επιβράδυνση της οξείδωσης λαχανικών και φρούτων, του ενζυμικού μαυρίσματος και του ταγγισμού. Επίσης, η ρύθμιση της συγκέντρωσης CO_2 θα εξαλείψει τον κίνδυνο ανάπτυξης αναερόβιας μικροβιακής δραστηριότητας. Ακόμα, τα φιλμ έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες και αντιμικροβιακή δράση, η οποία προκύπτει από την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση των θετικά φορτισμένων πρωτονιωμένων αμινομάδων της χιτοζάνης με την αρνητικά φορτισμένη κυτταρική μεμβράνη των μικροβίων.^[65]

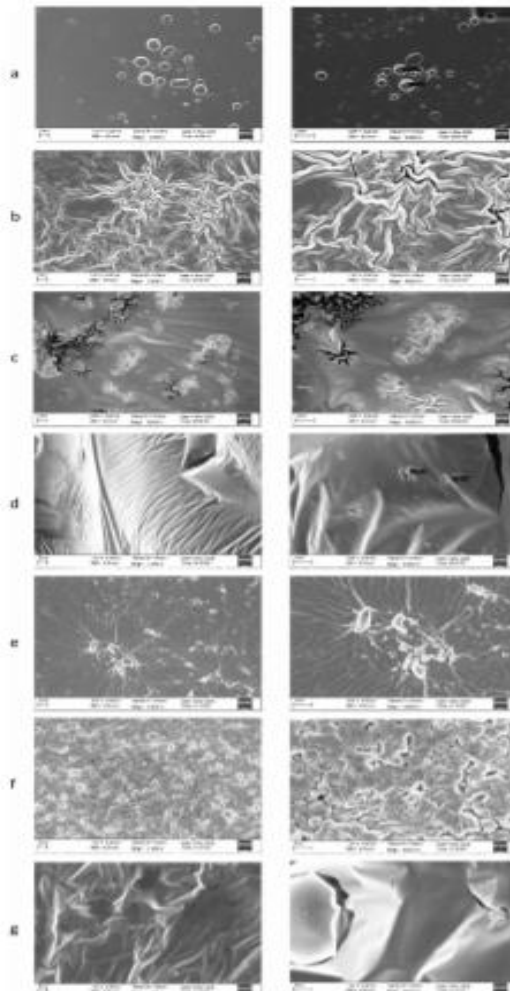
Όσον αφορά στα μειονεκτήματα των φιλμ ως συσκευασίες, το μεγαλύτερο είναι η υψηλή διαπερατότητα υδρατμών που εμποδίζει τον έλεγχο της υγρασίας του τροφίμου. Όλες οι παραπάνω ιδιότητες καθιστούν τα φιλμ κατάλληλα και για wound healing επιδέσμους.

5.4 Ο ρόλος των NADES στην τεχνολογία παρασκευής των φιλμ χιτοζάνης

Πλέον η έρευνα έχει επικεντρωθεί στη χρήση πλαστικοποιητών και πρόσθετων στα φιλμ για την ενίσχυση των ιδιοτήτων τους ως ενεργές συσκευασίες. Αρχικά, η χρήση πλαστικοποιητών μειώνει τη διαμοριακή αλληλεπίδραση μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων καθιστώντας το πιο ελαστικό και λιγότερο εύθραυστο. Παρ' όλα αυτά, η προσθήκη πλαστικοποιητών αυξάνει τον ελεύθερο όγκο και τη μοριακή κινητικότητα του πολυμερικού δικτύου κάνοντάς το αραιότερο και συνεπώς, περισσότερο διαπερατό. Αυτό επηρεάζει τον έλεγχο διαπέρασης των αερίων και αυξάνει τη διαπερατότητα υδρατμών, κάτι ανεπιθύμητο.^[58]

Παραδείγματα πλαστικοποιητών αποτελούν οι DESs, ενώ παράλληλα εκδηλώνεται ενδιαφέρον στη μελέτη ενισχυμένων με φυσικά εκχυλίσματα φιλμ.

Οι DESs και η χιτοζάνη κατανέμονται ομοιόμορφα στην πολυμερική μήτρα αλληλεπιδρώντας με δεσμούς υδρογόνου. Έτσι, οι DESs μπορούν να λειτουργήσουν επιτυχώς ως πλαστικοποιητές. Η χρήση τους βελτιώνει την ελαστικότητα και την επιμήκυνση του φιλμ, η οποία επηρεάζεται ισχυρά από το βαθμό αποακετυλίωσης και η ελαστικότητα αυξάνεται με αύξηση του περιεχομένου σε DES. Επιπρόσθετα, σε χαμηλές περιεκτικότητες DES αυξάνεται ελαφρώς η επιφανειακή σκληρότητα, ενώ όταν η περιεκτικότητα ξεπερνά το 60% w/w μειώνεται.^[68] Θετικό αποτελεί και το γεγονός ότι τα υδατικά διαλύματα DES είναι γενικά όξινα επαρκώς για να διαλύσουν τη χιτοζάνη χωρίς προσθήκη οξέων.



Εικόνα 10. SEM εικόνες των (a) F / AA (οξικό οξύ), (b) F / Tween, (c) F / Bet:LA NADES, (δ) F / ChCl:LA NADES, (e) F 0.5LA (f) F / Bet:LA mix. και (g) F / ChCl: μείγμα LA. Οι εικόνες στα αριστερά είναι σε $5 \cdot 10^3$ μεγέθυνση και στα δεξιά σε 10^4 μεγέθυνση.^[69]

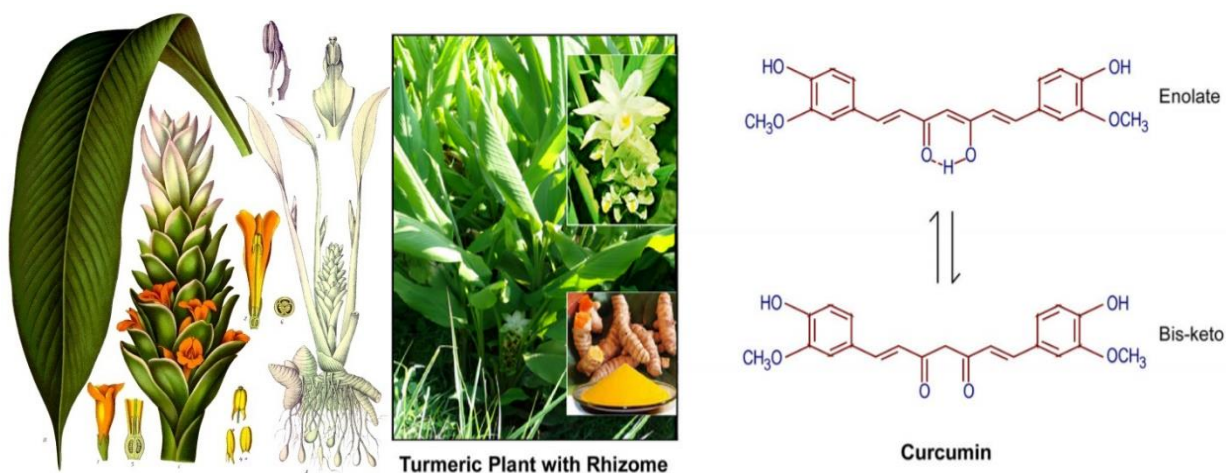
Ένα σημαντικό μειονέκτημα της χρήσης DES είναι πως επειδή στην πλειοψηφία τους έχουν πολύ υδρόφιλο χαρακτήρα επιτρέπουν τη διάχυση υδρατμών και, άρα, έχουν υψηλό ρυθμό διαπερατότητας υδρατμών.^[58] Αυτό δίνει στα φιλμ επιθυμητές ιδιότητες για επούλωση πληγών, αλλά όχι για συσκευασίες.

Η ενσωμάτωση φυτικών εκχυλισμάτων στα φιλμ χιτοζάνης έχει ως στόχο την ενίσχυση των αντιοξειδωτικών και αντιμικροβιακών ιδιοτήτων. Αυτή η μελέτη γίνεται με στόχο την πιθανή δημιουργία ακόμη πιο ενεργών συσκευασιών τροφίμων για επέκταση του χρόνου ζωής τους και τη δημιουργία βρώσιμων συσκευασιών με αντιοξειδωτικά χαρακτηριστικά. Παράλληλα, η ενσωμάτωση και ενίσχυση των φιλμ χιτοζάνης με φαινολικά συστατικά, έχει αποδειχθεί ότι ενισχύει την αντοχή σε εφελκυσμό, ενώ αυξάνει την πυκνότητα των φιλμ λογικά λόγω αλληλεπίδρασης των εκχυλισμένων ενώσεων (κυρίως φαινολικών) με δεσμούς υδρογόνου με τη χιτοζάνη.^{[63] [64] [65]}

Ο συνδυασμός της Πράσινης Εκχύλισης φυτικών συστατικών με NADESs και η ενσωμάτωση αυτών σε φιλμ χιτοζάνης υπόσχεται τη δημιουργία ενός φυσικού ελαστικού, μη τοξικού, βιοαποικοδομήσιμου φιλμ με αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Η επιλογή των συστατικών ενσωμάτωσης μπορεί να γίνει και με γνώμονα την υδροφιλικότητά τους. Η χρήση υδρόφιλων πλαστικοποιητών έχει συνδεθεί με τη δημιουργία αραιότερου και πιο διαπερατού δικτύου, ενώ η χρήση πλαστικοποιητών με μικρότερη ικανότητα πρόσδεσης και γενικότερα αλληλεπίδρασης με το νερό δημιουργεί λιγότερο διαπερατά σε υδρατμούς φιλμ.^[58] Έτσι, ενδεχομένως, όσο πιο υδρόφοβα είναι τα συστατικά, τόσο μικρότερη θα είναι η ικανότητα αλληλεπίδρασης με το νερό και, άρα, τόσο μειωμένη θα είναι η διαπερατότητα του φιλμ σε υδρατμούς.

Κεφάλαιο 6. Κουρκουμίνη

Η κουρκουμίνη καλείται, επίσης, και διφερουλοϋλμεθάνιο (diferuloylmethane) και αποτελεί το κύριο φυσικό φαινολικό συστατικό του κουρκουμά.^[70] Ο κουρκουμάς ή *Curcuma Longa* ή κιτρινόριζα (Turmeric) είναι ένα ριζωματώδες πολυετές φυτό της οικογένειας *Zingiberaceae*, όπως το *Zingiber officinale Roscoe*.^[71] Καλλιεργείται σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές με πρώτο παγκόσμιο παραγωγό την Ινδία, ενώ έχει εκδοθεί και μονόγραμμα από τον ΠΟΥ που τον κατατάσσει ως φαρμακευτικό βότανο.^{[72] [73]}



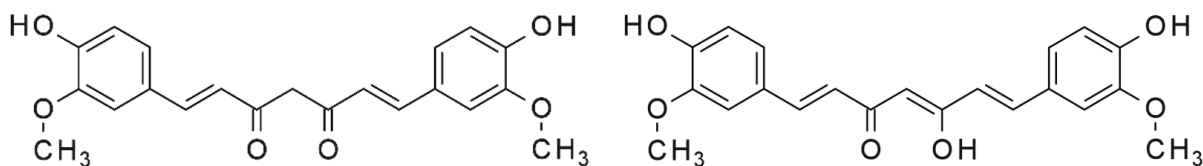
Εικόνα 11. Αριστερά το φυτό του κουρκουμά^[41] και δεξιά οι δύο μορφές της κουρκουμίνης.^[68] Σε όξινο και ουδέτερο pH επικρατεί η μορφή της δικετόνης.

Το κύριο συστατικό του κουρκουμά είναι το κίτρινο έως πορτοκαλοκίτρινο πτητικό λάδι (6%) που αποτελείται από μονοτερπένια και σεσκιτερπένια συμπεριλαμβανομένων του ζιγκιπερενίου, του κουρκουμενίου, της α- και β-κουρκούμης. Το χρώμα οφείλεται στα κουρκουμενοειδή, 50-60% των οποίων αποτελούν οι κουρκουμίνη, μονοδιμεθοξυ-κουρκουμίνη (DMC) και βις-διμεθοξυ-κουρκουμίνη (BDMC).^{[70] [73]} Η κουρκουμίνη προέρχεται είτε από την εκχύλιση κουρκουμά είτε μέσω σύνθεσής της με τη μέθοδο Rabon. Η εκχύλιση κουρκουμά αφορά κυρίως σε τεχνικές υπερήχων, μικροκυμάτων, Soxhlet, υπερκρίσιμου CO_2 με ύστερη απομόνωσή της με χρήση χρωματογραφικών στηλών.^[72]

Η κουρκουμίνη έχει πληθώρα χρήσεων, όπως ως αφέψημα, χρωστική, μπαχαρικό στη μαγειρική, πρόσθετο σε τρόφιμα και ποτά, σε καλλυντικά και φάρμακα και ως συντηρητικό και χρωστική για μουςτάρδες, πατατάκια και τυριά.^[71]

6.1 Δομικά χαρακτηριστικά

Η κουρκουμίνη είναι συμμετρικό μόριο με χημικό τύπο $C_{21}H_{20}O_6$. Η IUPAC ονομασία της είναι (1E,6E)-1,7-δι-(4-υδροξυ-3-φαινοξυφαινυλο)επτα-1,6-διενο-3,5-διόνη. Το μόριο της είναι ένα ασθενές οξύ κατά Brønsted με τρία ευκίνητα πρωτόνια και το οποίο μπορεί να χωριστεί σε τρία χημικά τμήματα, τους δύο αρωματικούς δακτυλίους που περιέχουν ο-μεθοξυφαινολικές ομάδες και οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους με μία αλυσίδα επτά ατόμων άνθρακα αποτελούμενη από ένα α,β-ακόρεστο τμήμα β-δικετόνης.^{[70] [72]}



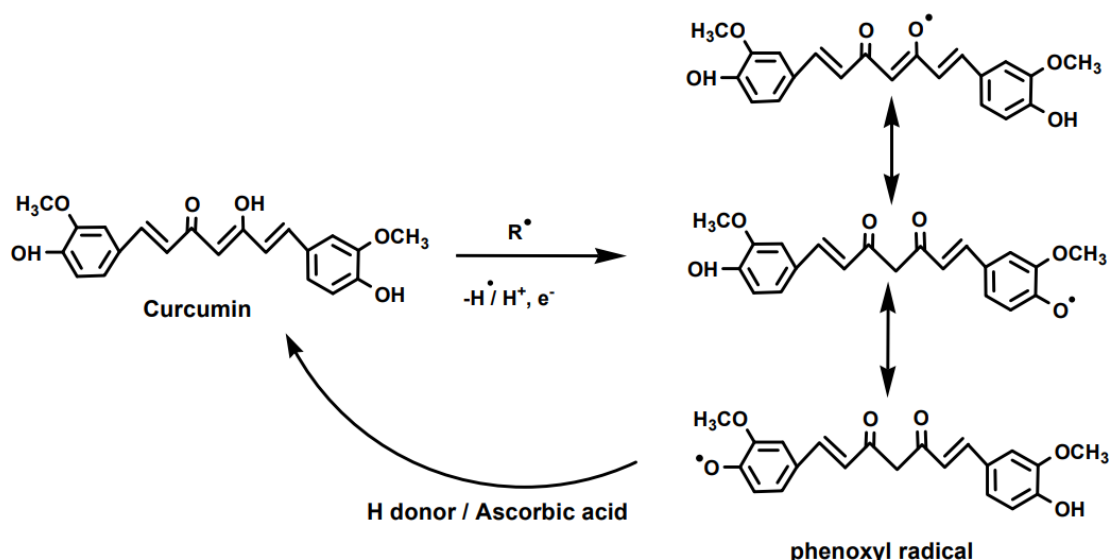
Σχήμα 7. Η κουρκουμίνη σε μορφή δικετόνης (αριστερά) και σε μορφή ενόλης (δεξιά).

Η δικετο-ομάδα εμφανίζει ταυτομέρεια κετο-ενόλης και αναλόγως του περιβάλλοντος μπορεί να υπάρχει σε πολλές διαμορφώσεις. Στην κρυσταλλική δομή απαντάται η διαμόρφωση cis-ενόλης, η οποία σταθεροποιείται μέσω δεσμών υδρογόνου και η δομή αποτελείται από 3 υποκατεστημένες επίπεδες ομάδες που διασυνδέονται μέσω δύο διπλών δεσμών. Η κουρκουμίνη είναι ένα υδρόφοβο μόριο και συνεπώς, είναι πρακτικά αδιάλυτη στο νερό ($0.6\mu\text{g}/\text{mL}$). Εμφανίζει καλή διαλυτότητα σε ορισμένους πολικούς διαλύτες, όπως η μεθανόλη, η αιθανόλη, το χλωροφόρμιο και το DMSO. Απορροφά τόσο στη ζώνη του ορατού (410-430nm), όσο και στη ζώνη του υπεριώδους (265nm).^[72]

Το μόριο της κουρκουμίνης είναι ιδιαίτερα δραστικό χάρη στις τρεις λειτουργικές ομάδες της: της δικετόνης και των δύο φαινολικών ομάδων. Η βιολογική της δράση προκύπτει από τις αντιδράσεις που συμμετέχει, όπως σε αντιδράσεις υδρόλυσης, αποικοδόμησης, ενζυμικές, μεταφοράς υδρογόνου που οδηγεί σε οξειδωσή της, αντιστρεπτές και μη νουκλεόφιλες προσθήκες (Michael reactions) και σχηματισμού νανοσυζευγμάτων και μεταλλικών συμπλόκων.^[72]

Η κουρκουμίνη διαθέτει εξαιρετική αντιοξειδωτική δράση αντιδρώντας με τις περισσότερες ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS), ρυθμίζοντας τη δραστηριότητα των ενζύμων (GSH, καταλάση, SOD) που καταλύουν την εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών και εμποδίζει τη λειτουργία των ενζύμων που δημιουργούν ελεύθερες ρίζες.^[71] Και τα τρία μέρη του μορίου της κουρκουμίνης είναι εν δυνάμει οξειδούμενα από τις ελεύθερες ρίζες μέσω μεταφοράς ηλεκτρονίου και υδρογόνου. Το πιο ευκίνητο υδρογόνο είναι του υδροξυλίου της φαινολικής ομάδας με την απόσπαση του οποίου σχηματίζονται φαινολικές ρίζες, οι οποίες

με τη χρήση άλλου δότη υδρογόνου (πρωτονιοδότης) μπορούν να επιστρέψουν στη αρχική μορφή της κουρκουμίνης.^[72]



Σχήμα 8. Πιθανοί τρόποι αλληλεπίδρασης της κουρκουμίνης με ελεύθερες οξειδωτικές ρίζες και αναγέννησή της με ασκορβικό οξύ.^[72]

Η κουρκουμίνη είναι γενικά ασταθής και αποδομείται σε υδατικά και οργανικά διαλύματα. Σε αραιά διαλύματα η υποβάθμισή της φτάνει σε ποσοστό 90% στα 30 λεπτά, ενώ αύξηση της συγκέντρωσης της κουρκουμίνης μειώνει την υποβάθμισή της και αύξηση του pH την αυξάνει. Επίσης, η κουρκουμίνη υπόκειται φωτοοξείδωση στο υπεριώδες-ορατό προς σχηματισμό βανιλίνης, φερουλικό οξύ (Ferulic Acid) και άλλων φαινολών.^{[70] [72]}

Η βάση για τις περισσότερες ιδιότητές της είναι η ισχυρή αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδης δράση της. Η κουρκουμίνη έχει δράση αντιβιοτική, αντιμυκητιασική, αντιβακτηριακή, αντιική, κατά του πεπτικού έλκους, αναλγητική, αντικαταθλιπτική, ανοσοδιεγερτική, ιστοπροστατευτική, νεφροπροστατευτική, αντιαμυλοειδή, αντιδιαβητική, χημειοπροστατευτική, αντινεοπλασματική, αντικαρκινική. Ακόμα, μπορεί να αντιμετωπίσει την τοξικότητα πολλών οργάνων, όπως της καρδιάς, του ήπατος, των νεφρών και να καταπολεμήσει τον καταρράκτη, την πνευμονική ίνωση και να δράσει ως επουλωτικός παράγοντας.^{[70] [71] [72] [73] [75]}

6.2 Μη βιοδιαθεσιμότητα κουρκουμίνης και δυσκολίες που ανακύπτουν

Μολονότι η κουρκουμίνη δύναται να αποτελέσει ισχυρό φάρμακο για ποικίλες ασθένειες, η χρήση της δεν είναι ως τώρα απόλυτα επιτυχής λόγω της μη διαλυτότητας σε υδατικό μέσο, του γρήγορου μεταβολισμού της σε μη δραστικές μορφές σε υδατικά διαλύματα (pH=7.4),

της χαμηλής απορρόφησής της από τα κύτταρα και της ταχείας αποβολής της από τον οργανισμό.^{[70] [71] [72]} Έτσι, ενώ είναι ισχυρό φάρμακο, είναι πρακτικά μη βιοδιαθέσιμη στον ανθρώπινο οργανισμό που σημαίνει ότι ο οργανισμός δεν μπορεί να την αξιοποιήσει σε συγκεντρώσεις απαραίτητες για την καταπολέμηση σοβαρών ασθενειών. Γι' αυτό το λόγο έχουν αναπτυχθεί νέα συστήματα διάλυσης και αξιοποίησης της κουρκουμίνης για να ενισχυθεί η βιοδιαθεσιμότητά της.

Η επίτευξη ικανοποιητικής βιοδιαθεσιμότητας της κουρκουμίνης μπορεί να επιτευχθεί με την αύξηση της διαλυτότητας αυτής, της απορρόφησής της από τον ανθρώπινο οργανισμό, της αποτροπής υποβάθμισής της σε μη δραστικά μόρια μετά την πρόσληψή της και μέσω της σταδιακής απελευθέρωσής της από το εκάστοτε φαρμακευτικό σκεύασμα.

Οι αρχικές μελέτες αφορούσαν στην χρήση ενώσεων που αυξάνουν τη βιοδιαθεσιμότητα, όπως η πιπερίνη, η ελαιορητίνη και το έλαιο κουρκουμά. Με τους παράγοντες αυτούς διεγείρεται και η απορρόφησή της από το γαστρεντερικό σωλήνα. Η κουρκουμίνη είναι λιπόφιλη και έτσι, η παράλληλη με λιπίδια χορήγησή της δύναται να αυξήσει τη βιοδιαθεσιμότητά της και να μειώσει και την ταχύτητα εξόδου από τον οργανισμό. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί φαρμακοτεχνικές μορφές που χρησιμοποιούν την προσρόφηση και τη διασπορά της κουρκουμίνης σε διάφορες μήτρες, όπως οι γ-κυκλοδεξτρίνες, το ρυζάλευρο και το στεατικό οξύ. Ακόμα, έχουν δημιουργηθεί συστήματα μικκυλίων και νανοσωματιδίων που περικλείουν την κουρκουμίνη με σκοπό την επίτευξη υψηλότερης βιοδιαθεσιμότητας και τη μείωση της επίδρασης της τροφής που μπορεί να οδηγήσει σε ασταθή βιοδιαθεσιμότητα ανάλογα με την κατάσταση νηστείας του ασθενούς. Γενικά, η μελέτη αφορά στη χρήση βιοσυμβατών οργανικών φορέων (λιποσωμάτων, υδρογελών, κυτταρίνης, πολυαιθυλενογλυκολών, βιοπολυμερών) ή στο σχηματισμό υπερμοριακών δομών (κυκλοδεξτρίνες, κουρκουβιτουρίλη). Η διαλυτοποίηση της κουρκουμίνης σε τέτοια συστήματα γίνεται μέσω παγίδευσης αυτής σε υδρόφοβα σημεία μέσω υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων.^{[70] [71] [72]}

Τα πλέον καινοτόμα συστήματα μεταφοράς της κουρκουμίνης αφορούν μικρογαλακτώματα, νανογαλακτώματα, μικκύλια, λιποσώματα, λιπιδικά νανοσωματίδια. Τα συστήματα αυτά βελτιώνουν την διαλυτότητα της κουρκουμίνης σε επίπεδο κολλοειδών μέσα από την διαλυτοποίηση του φαρμάκου σε κολλοειδή διασπορά. Η σταθεροποίηση και αύξηση της διαλυτότητας βελτιώνει ουσιαστικά τη βιοδιαθεσιμότητα και αποτελεσματικότητά της δραστικής ουσίας.^{[70] [72]}

Επιπρόσθετα, νέες μελέτες τελούνται για την εύρεση νέων διαλυτών-φορέων της κουρκουμίνης. Τέτοιοι διαλύτες είναι τα ΙΥ και οι NADESs, οι οποίοι εμφανίζουν αρκετά υψηλή διαλυτότητα κουρκουμίνης, ενώ παράλληλα αξιοποιούνται και ως προστατευτικοί και σταθεροποιητικοί φορείς ενάντια στην υποβάθμισή της.^[76] Όσον αφορά στους NADESs, η αυξημένη ικανότητα διάλυσης (περίπου 8 mg/g) οφείλεται ενδεχομένως στη σταθεροποίηση του συμπλόκου διαλύτη-κουρκουμίνης μέσω δεσμών υδρογόνου της γειτονικής υδροξυλομάδας με μία από τις κεντρικές κετο-ομάδες.^[74] Επιπλέον, χάρη στην προκατεργασία

με NADES η διαλυτότητα στο γαστρικό υγρό μπορεί να αυξηθεί 3.5 φορές και στο εντερικό να διπλασιαστεί. Βέβαια, η διαλυτότητα στο γαστρικό υγρό είναι ούτως ή άλλως αρκετά υψηλότερη.^[74] Αυτό που κεντρίζει το ενδιαφέρον στη χρήση NADESs είναι η φυσική προέλευσή τους που γενικά τους καθιστά μη τοξικούς και βιοαποικοδομήσιμους και γι' αυτό θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς της κουρκουμίνης.

Η ανάπτυξη φαρμακευτικών συστημάτων και σκευασμάτων με υψηλή βιοδιαθεσιμότητα κουρκουμίνης δίνει τη δυνατότητα αξιοποίησης των εκτεταμένων ιδιοτήτων της στην καταπολέμηση σοβαρών ασθενειών. Τέτοιες ασθένειες είναι η νόσος Πάρκινσον (Parkinson), το Αλτσχάιμερ (Alzheimer), η σκλήρυνση κατά πλάκας, ο καρκίνος, εγκεφαλικές βλάβες μετά από ατύχημα, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, η επίκτητη ανοσοσολογική ανεπάρκεια (AIDS) και διάφορες νευροψυχιατρικές διαταραχές, όπως η κατάθλιψη, το μετατραυματικό στρες (PTSD), η ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή (OCD), η διπολικότητα, η ψύχωση και ο αυτισμός.^{[70] [71] [72]}



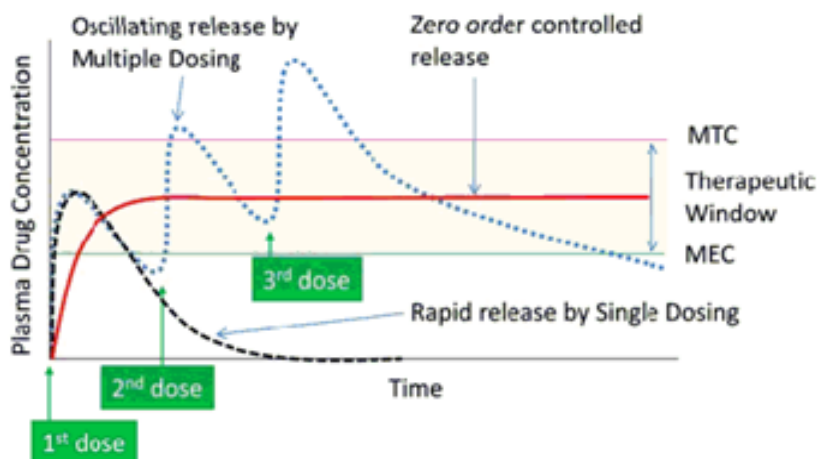
Σχήμα 9. Χρήση της κουρκουμίνης σε διάφορες νευροεκφυλιστικές διαταραχές.

Κεφάλαιο 7. Νανοσυστήματα

Η χορήγηση ενός φαρμάκου στον ασθενή οφείλει να επιτυγχάνει συγκεκριμένα αποτελέσματα, δηλαδή να αναγνωρίζει το ασθενές σημείο, να θεραπεύει την ασθένεια και να μην αποβαίνει τοξικό για τον οργανισμό. Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται έχουν ως βάση βιοδραστικές ενώσεις, οι οποίες, όπως έχει πρωτύτερα σημειωθεί, μπορεί να εμφανίζουν προβλήματα βιοδιαθεσιμότητας, αστάθειας, αποδόμησης και συνεπώς, η μέθοδος χορήγησης τους δεν είναι αποτελεσματική. Πλέον το ενδιαφέρον έχει εστιαστεί στη δημιουργία νέων φαρμακοτεχνικών μορφών που θα επηρεάζουν την φαρμακοκινητική των ουσιών και συνεπώς τη θεραπευτική αποτελεσματικότητα του εκάστοτε σκευάσματος. Προς αυτή την κατεύθυνση έχει εισαχθεί και ο εγκλεισμός βιοδραστικών ενώσεων σε σωματίδια-φορείς με συγκεκριμένες ιδιότητες και γεωμετρία. Ο εγκλεισμός, συνήθως, αναφέρεται σε μικρο- (1 μ m-1mm) και νανοκλίμακα (<1 μ m) με τους νανοφορείς να επιδεικνύουν καλύτερα αποτελέσματα. [79]

Ο εγκλεισμός των βιοδραστικών ενώσεων σε νανοφορείς επιτυγχάνει την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητάς τους στον οργανισμό ως αποτέλεσμα της σταθεροποίησης, της αύξησης της διαλυτότητας και της προστασίας τους από αποδόμηση και οξείδωση σε μη δραστικούς δευτερογενείς μεταβολίτες. Ειδικότερα, μέσω του εγκλεισμού δίνεται η δυνατότητα τροποποίησης των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των φαρμακευτικών ουσιών, ενώ οι ίδιες οι φυσικοχημικές ιδιότητες των σωματιδίων επηρεάζουν την πορεία, το χρόνο ημιζωής και το μεταβολισμό των ενώσεων. Τα νανοσυστήματα λειτουργούν σταθεροποιητικά και προστατευτικά για τις δραστικές ουσίες ως προς την υποβάθμισή τους λόγω εξωγενών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Έτσι, μετά τη χορήγησή τους στον οργανισμό, οι εγκλεισμένες ενώσεις δεν αποδομούνται ή υποβαθμίζονται ταχέως από το περιβάλλον (πχ το στομαχικό ή εντερικό υγρό) και διατηρούνται στη δραστική τους μορφή για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Στη συνέχεια, οφείλεται να τονιστεί πως η νανοδιάσταση επηρεάζει σημαντικά την προσκόλληση και αλληλεπίδραση των νανοσωματιδίων με τις βιολογικές μεμβράνες. Τα νανοσωματίδια μπορούν να δημιουργηθούν με τρόπο που να αναγνωρίζουν και να αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένα κύτταρα-στόχο. Είναι, επομένως, δυνατή η στοχευμένη αποδέσμευση της δραστικής ουσίας. Δηλαδή τα νανοσωματίδια μπορούν να στοχεύουν συγκεκριμένα κύτταρα του οργανισμού με τα αλληλεπιδρούν και απελευθερώνουν τη δραστική τους σε αυτά, αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου και μειώνοντας την τοξικότητά του για τον υπόλοιπο οργανισμό. Επιπλέον, η χρήση νανοφορέων παρέχει την ευχέρεια της ελεγχόμενης αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας. Μπορούν να δημιουργηθούν νανοσυστήματα με προκαθορισμένο ρυθμό απελευθέρωσης δραστικής σε κάθε χρονική στιγμή. Ενώ η απλή χορήγηση της δραστικής αυξάνει απότομα σε μικρή διάρκεια τη συγκέντρωσή της στο πλάσμα και ύστερα αυτή αποβάλλεται από τον οργανισμό, οι νανοφορείς επιτυγχάνουν σταδιακή και παρατεταμένη χρονικά αποδέσμευση της δραστικής διατηρώντας τη συγκέντρωση στον οργανισμό σε επιθυμητά επίπεδα. Τέλος,

οι νανοφορείς δύνανται να συγκαλύψουν ανεπιθύμητες ιδιότητες της δραστικής ουσίας, όπως άσχημα γεύση και οσμή, κάνοντας την στοματική λήψη τους λιγότερο δυσάρεστη.^[83]
[84]



Εικόνα 12. Προφίλ Απελευθέρωσης φαρμάκου. Επιδιώκεται παρατεταμένο χρονικό διάστημα απελευθέρωσης εντός του «θεραπευτικού παραθύρου».^[87]

Προηγουμένως, αναφέρθηκε το πρόβλημα βιοδιαθεσιμότητας της κουρκουμίνης ως εμπόδιο για την αξιοποίηση των φαρμακευτικών της ιδιοτήτων στην καταπολέμηση ασθενειών. Με βάση τα παραπάνω, ο εγκλεισμός της από νανοσυστήματα μεταφοράς μπορεί να επιτύχει αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας μέσω:

Στοχευμένης μεταφοράς στα κύτταρα με μη φυσιολογική λειτουργία

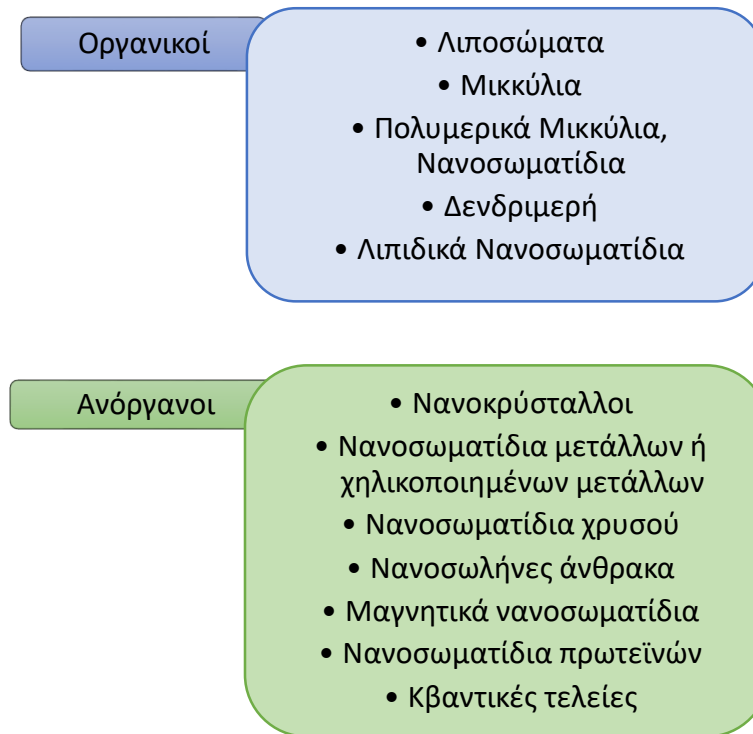
Ελεγχόμενης και παρατεταμένης αποδέσμευσης για συνεχόμενα αποτελέσματα

Προστασίας και σταθεροποίησης για μεγαλύτερο χρόνο ζωής εντός του οργανισμού

Έτσι, αυξάνεται ο χρόνος που μπορεί να δράσει πριν αποβληθεί, η συνολική ποσότητα που αξιοποιείται και η απορρόφησή της χάρη στην αλληλεπίδραση φορέα-κυττάρου.^{[85] [86]}

7.1 Παραδείγματα νανοφορέων και κριτήρια επιλογής

Οι νανοφορείς μπορεί να είναι οργανικοί ή ανόργανοι.^{[80] [82]}

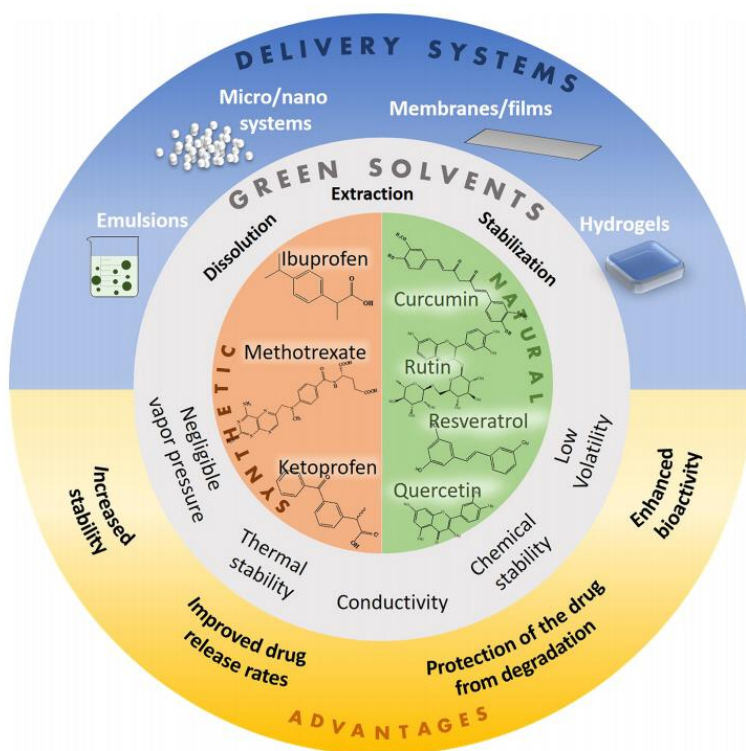


Σχήμα 10. Παραδείγματα νανοφορέων.

Για την επιλογή κάθε φορά του κατάλληλου νανοφορέα για την ενθυλάκωση της δραστικής ουσίας οι παράγοντες που εξετάζονται είναι η φύση του φορέα, της ουσίας και της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης, οι φυσικοχημικές ιδιότητες της δραστικής, τα κύτταρα-στόχος και τα φυσικά χαρακτηριστικά (σχήμα, μέγεθος, επιφανειακό φορτίο, επιφανειακή υδροφιλικότητα) που καθορίζουν την αλληλεπίδραση των φορέων με τα διάφορα κύτταρα. Σημαντικό ρόλο έχει το προφίλ απελευθέρωσης της δραστικής, δηλαδή η κινητική αποδέσμευσης από το φορέα που παρέχει παρατεταμένο αποτέλεσμα και τέλος, η λειτουργικότητα των σχηματιζόμενων σωματιδίων.^[81]

Κεφάλαιο 8. Χολίνη:Γερανικό οξύ - CAGE (Choline And GERanate or Choline And GERanic acid)

Η ανάγκη εύρεσης ικανών διαλυτών και φορέων φαρμακευτικών ουσών για τη δημιουργία συστημάτων μεταφοράς φαρμάκου τοπικής εφαρμογής έφερε στο προσκήνιο τη χρήση ΙΥ και DESs σε αυτό τον τομέα. Και τα ΙΥ και οι DESs χαίρουν αποδοχής σχετικά με την αντιμικροβιακή και αντιμυκητιασική δράση τους, ενώ ταυτόχρονα δύνανται να αυξήσουν τη διαλυτότητα δραστικών ουσιών και λειτουργούν ως φορείς για τη φαρμακευτική χορήγησή του αυξάνοντας τη βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου στον οργανισμό.^[88]



Σχήμα 11. Αξιοποίηση ΙΥ και DESs για τη δημιουργία συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων.^[88]

Το 2014 μία ομάδα επιστημόνων (Samir Mitragotri et. al.) μελέτησε τη χρήση ΙΥ για τη διαδερμική μεταφορά φαρμάκου με σκοπό την αντιμετώπιση παθογόνων μικροοργανισμών. Από την έρευνα αυτή ανέκυψαν πολύ σημαντικά και ενδιαφέροντα συμπεράσματα, καθώς όντως τα ΙΥ βοηθούν στην καλύτερη μεταφορά φαρμάκου στα επιθηλιακά κύτταρα και καταπολεμούν αποτελεσματικά το ανθεκτικό βιοφίλμ των μικροοργανισμών. Το πιο σημαντικό, όμως, που προέκυψε είναι η ανακάλυψη ενός νέου ΙΥ με εξαιρετικές αντιμικροβιακές ιδιότητες και ικανότητα μεταφοράς φαρμακευτικών ουσιών. Αυτό το ΙΥ αφορά στο CAGE 1:2, το οποίο προέρχεται από τη χολίνη και το γερανικό οξύ. Αυτό που έδειξε η μελέτη είναι ότι το ίδιο το ΙΥ έχει ταχεία δράση κατά των μικροοργανισμών, ενισχύει τη διαπερατότητα

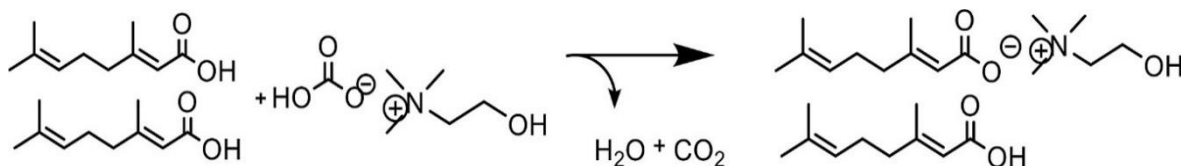
Χολίνη:Γερανικό οξύ - CAGE (Choline And GERanate or Choline And GERanic acid)

της δραστικής ουσίας βαθιά μέσα στο δέρμα καλύτερα και από τους ευρέως χρησιμοποιούμενους ενισχυτές διαπερατότητας. Επιπλέον, αν και τα αρχικά του συστατικά προκαλούν ερεθισμό στο δέρμα, το τελικό ΙΥ εμφανίζει αμελητέα τοξικότητα για τα επιθηλιακά κύτταρα του οργανισμού και δεν προκαλεί δερματικούς ερεθισμούς.^[89]

Η μελέτη του CAGE 1:2 συνεχίστηκε και το 2016, όποτε και διερευνήθηκε η δυνατότητά του ως αντισηπτικός παράγοντας. Ευρέθη, λοιπόν, πως το CAGE 1:2 και σε μικρές συγκεντρώσεις στο σκεύασμα (<1% κατ' όγκο CAGE 1:2) εξουδετερώνει βακτήρια, μύκητες, ιούς, ενώ παράλληλα αποδεικνύεται αξιοσημείωτα αγαθό ως προς τα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα και τα ποντίκια επιδεικνύοντας αμελητέα τοξικότητα τοπικά ή σε ολόκληρο τον οργανισμό.^[90]

8.1 Λίγα λόγια για το CAGE 1:2

Το CAGE 1:2 προέρχεται από την αντίδραση του Choline bicarbonate με το γερανικό οξύ σε αναλογία ισοδύναμων μερών 1 προς 2 αντίστοιχα. Η αντίδραση που περιγράφει την παραγωγή του CAGE 1:2 είναι η εξής:^[96]



Σχήμα 12. Αντίδραση σχηματισμού CAGE 1:2.

Κατά την ανάμιξη των συστατικών παράγεται αέριο διοξείδιο του άνθρακα, το οποίο μαζί με το νερό απομακρύνονται μετά το πέρας της αντίδρασης αφήνοντας πίσω καθαρό το CAGE 1:2. Για την απομάκρυνση του νερού χρησιμοποιούνται τεχνικές όπως η εξάτμιση υπό κενό ή και η λυοφιλοποίηση.

Αναφορικά με την κατηγοριοποίηση του ως διαλύτη υπάρχει σοβαρή δυσκολία. Υπενθυμίζεται ότι στα ΙΥ σχηματίζονται έπειτα από αντιδράσεις μεταξύ των αρχικών συστατικών τους. Στην περίπτωση των πρωτικών ΙΥ, ο σχηματισμός στους προκύπτει έπειτα από μεταφορά πρωτονίου μεταξύ ενός οξέος σε μια βάση. Επιπλέον κατά τον ορισμό των ΙΥ, ένα σύστημα για να θεωρείται ΙΥ θα πρέπει να αποτελείται αποκλειστικά από ιόντα και να βρίσκεται σε υγρή κατάσταση σε ένα ευρύ θερμοκρασιακό εύρος σε θερμοκρασίες χαμηλότερες συνήθως των 100° C. Αντιθέτως, οι DESs σχηματίζονται από τη δημιουργία ισχυρού δικτύου δεσμών υδρογόνου μεταξύ ενώσεων, όχι απαραίτητα ιόντων.

Το CAGE 1:2, λοιπόν, αναφέρεται στη βιβλιογραφία και ως ΙΥ και ως DES. Παρόλα αυτά θα μπορούσε να χαρακτηριστεί πως είναι ένας «υβριδικός διαλύτης» κάτι μεταξύ των ΙΥ και των DES που μοιράζεται τις σημαντικές φυσικοχημικές ιδιότητες και των δύο κατηγοριών

Χολίνη:Γερανικό οξύ - CAGE (Choline And GERanate or Choline And GERanic acid)

πράσινων διαλυτών. Οι ιοντικές αλληλεπιδράσεις κατέχουν καθοριστικό ρόλο στη δημιουργία του (ούτως ή άλλως γίνεται μετάθεση πρωτονίου και παραγωγή νερού) και στις ιδιότητές του, ενώ η προκύπτουσα μειωμένη αγωγιμότητα φανερώνει τη σύζευξη ιόντων. Από την άλλη, στο σύστημα CAGE 1:2 υπάρχει ένα επιπλέον ισοδύναμο γερανικού οξέος που αποτελεί μία ουδέτερη ένωση ως προς τα άλλα δύο, αλλά η ύπαρξή του γεννά την αλληλεπίδραση των τριών μερών με δεσμούς υδρογόνου. Η αλληλεπίδραση αυτή ελαττώνει το σημείο τήξης και γι' αυτό καλείται DES. Το σύστημα που δημιουργείται περιλαμβάνει περίπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ ιοντικών και ουδέτερων ειδών.^[92]

Το εμπόδιο στην κατηγοριοποίηση του CAGE 1:2 δεν είναι μόνο η περίπλοκη δομή του, αλλά τα μη σαφή όρια στη χρήση των ορισμών του τι εστί ΙΥ και τι DES. Η έλλειψη ξεκάθαρων ορισμών και διαφοροποιήσεων μεταξύ τους κάνει την κατηγοριοποίηση πιο ρευστή. Άλλωστε στη βιβλιογραφία το CAGE 1:2 αναφέρεται και ΙΥ και DES για να μην περιοριστεί το σύστημα σε έναν ορισμό που δεν το εκφράζει απόλυτα.

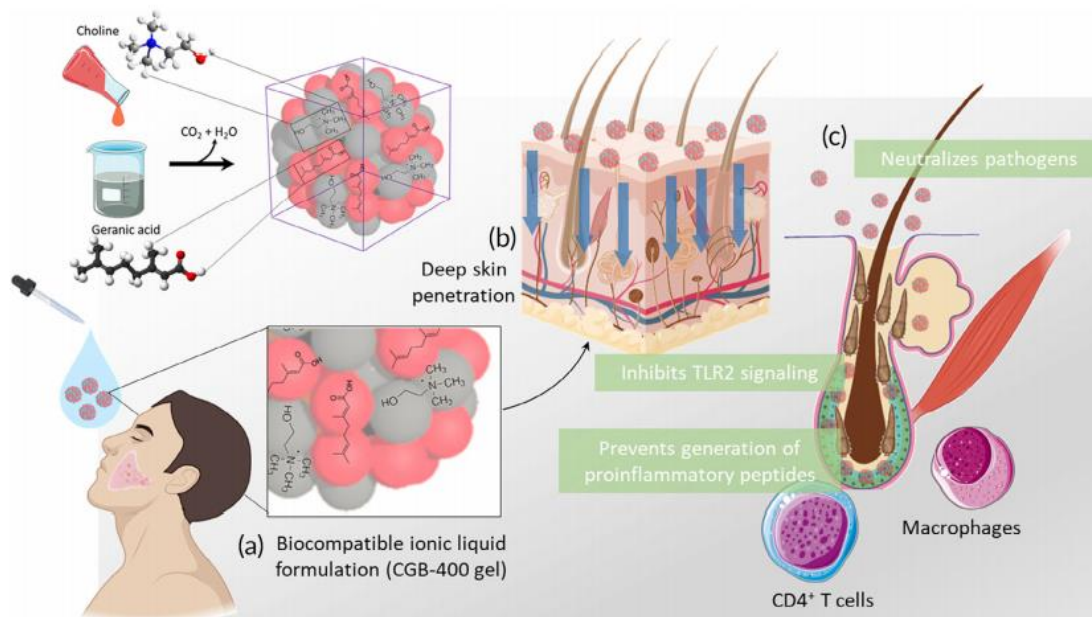
Από την σκοπιά της παρούσας διπλωματικής εργασίας το CAGE 1:2 δε θεωρείται αμιγώς DES ούτε παραδοσιακό ΙΥ. Αρχικά, το CAGE 1:1 είναι αναντίρρητα ΙΥ, καθώς αποτελείται αμιγώς από ιόντα, λαμβάνει χώρα αντίδραση και έχει σημείο τήξης κάτω από 100°C. Η προσθήκη ενός ακόμα ισοδύναμου μέρους γερανικού οξέος δημιουργεί ένα σύστημα choline:geranate:geranic acid 1:1:1. Άρα, η ύπαρξη του γερανικού που δε βρίσκεται σε μορφή ιόντος είναι αυτό που προκαλεί τριγμούς στη θεώρηση ως ΙΥ. Μεταξύ των συστατικών του αναπτύσσονται εκ νέου δεσμοί υδρογόνου, χαρακτηριστικό των DESs. Θα μπορούσε να ειπωθεί ότι το ΙΥ CAGE 1:1 αναπτύσσει δεσμούς υδρογόνου με το επιπλέον γερανικό και άρα, σχηματίζεται DES μεταξύ του CAGE 1:1 και του γερανικού οξέος. Βέβαια, θα μπορούσε γενικότερα να διατυπωθεί ότι το CAGE 1:2 είναι ευτηκτικό ιοντικό υγρό, καθώς ο όρος «βαθέως» δεν μπορεί να χρησιμοποιείται αυθαίρετα για κάθε ευτηκτικό μίγμα. Ακόμα, ένας ορισμός που δύναται να δοθεί είναι ότι το CAGE 1:2 αποτελεί ΙΥ με σύνθετο ανιόν [*choline*][*geranate₂H*] ή ότι αποτελεί διάλυμα ασθενούς πρωτικού ΙΥ, όπου το ΙΥ είναι πράγματι σχηματισμένο και αλληλεπιδρά με δεσμούς υδρογόνου που περιλαμβάνουν κι ουδέτερα είδη, δηλαδή το πρόσθετο γερανικό οξύ.^{[91] [92]} Σε κάθε περίπτωση, πρέπει να γίνει ενδελεχής έρευνα και ουσιαστική κατανόηση του τρόπου αλληλεπίδρασης και δομής του CAGE 1:2, ώστε να δοθεί ο κατάλληλος ορισμός.

Καταχρηστικά, στην παρούσα μελέτη, ο όρος CAGE θα αναφέρεται στο CAGE 1:2 αν δε δίνεται διευκρίνηση.

Η έρευνα συνεχίστηκε με μελέτες για το μηχανισμό εξουδετέρωσης των παθογόνων μικροοργανισμών από το CAGE, σύμφωνα με τον οποίο η χολίνη ελκύεται από την αρνητικά φορτισμένη κυτταρική μεμβράνη των παθογόνων και διευκολύνει τη διείσδυση του ιόντος γερανικού και του γερανικού οξέος εντός της λιπιδικής διπλοστιβάδας και τοιουτοτρόπως, ξεκινά η διάσπαση του κυττάρου. Μάλιστα η ύπαρξη της χολίνης είναι ζωτικής σημασίας για τη διείσδυση στο κύτταρο, ενώ η ικανότητα εξουδετέρωσης των μικροοργανισμών έχει να

Χολίνη:Γερανικό οξύ - CAGE (Choline And GERanate or Choline And GERanic acid)

κάνει με την περιεκτικότητα του CAGE σε γερανικό οξύ.^{[93] [95] [96]} Μία συγκέντρωση 6.5 – 13mM CAGE αναχαιτίζει τον πολλαπλασιασμό των παθογόνων κυττάρων, ενώ συγκεντρώσεις ίσες ή μεγαλύτερες από 26mM τα θανατώνουν.^[95] Επίσης, έχει δοκιμαστεί in vivo μελέτη μεγάλης κλίμακας για την καταπολέμηση των παθογόνων που προκαλούν ροδόχρους ακμή. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το CAGE διεισδύει βαθιά στα στρώματα του δέρματος διατηρώντας τη δομή του και καταπολεμά τους παθογόνους που κατοικούν βαθιά μέσα στο δέρμα.^[103]



Εικόνα 13. Σχηματική αναπαράσταση της χρήσης CAGE στην κλινική καταπολέμηση των υπεύθυνων για τη ροδόχρους ακμή παθογόνων.^[103]

Ένα ακόμα ενδιαφέρον εύρημα είναι πως το CAGE λειτουργεί εξαιρετικά ως φορέας πρωτεϊνών, με κύρια την ινσουλίνη, για διαδερμική μη επεμβατική εφαρμογή. Η ινσουλίνη διαλύεται στο CAGE χωρίς να επηρεάζεται η δευτεροταγής δομή της. Παράλληλα, το CAGE έχει την ικανότητα να εκχυλίζει τα λιπίδια της κεράτινης στιβάδας της επιδερμίδας ενισχύοντας κατ' αυτό τον τρόπο τη διεισδυτικότητα του ίδιου και την ινσουλίνη, ή άλλων ουσιών που φέρει, βαθιά μέσα στο δέρμα.^{[94] [102]} Τα αποτελέσματα είναι πολλά υποσχόμενα, καθώς επιτυγχάνεται σταδιακό και παρατεταμένο αποτέλεσμα μείωσης των επιπέδων σακχάρου στο αίμα, ενώ το CAGE φαίνεται μη κυτταροτοξικό και μη γονιδοτοξικό.^[102]

Αυτή την περίοδο υλοποιούνται μελέτες για τη χορήγηση με διάφορες μεθόδους (στοματικά, υποδόρια, ενδοφλέβια, παρεντερικά) ινσουλίνης με διαλύτη-φορέα το CAGE και εύρεση των φαρμακευτικών παραμέτρων του συστήματος. Επιπρόσθετα, το CAGE σε υψηλές συγκεντρώσεις εμφανίζει κυτταροτοξικό χαρακτήρα, επομένως, εάν χορηγηθεί απευθείας σε καρκινικά κύτταρα, τότε μπορεί να σταματήσει την ανάπτυξή του ή να τα θανατώσει

Χολίνη:Γερανικό οξύ - CAGE (Choline And GERanate or Choline And GERanic acid)

μέσω τοπικής κυτταροτοξικής δράσης. Εάν συνδυαστεί και με χημειοθεραπευτικές ενώσεις το αποτέλεσμα πολλαπλασιάζεται. Λειτουργεί προστατευτικά για τη βιοδραστικότητα των ουσιών που φέρει και γι' αυτό, θα μπορούσε να είναι ο παράγοντας διατήρησης των εμβολίων.^{[105] [106]}

Τέλος, το CAGE δρα ως διαδερμικός φορέας φλαβονοειδών με μεταξύ τους αλληλεπίδραση με δεσμούς υδρογόνου που αυξάνουν τη διαλυτότητα, ενώ έχει αναφερθεί η χρήση του στη μείωση πρόσληψης λίπους παρεμβαίνοντας στην απορρόφηση λίπους στο γαστρεντερικό σωλήνα και συνεπώς, περιορίζει την αύξηση του βάρους για την αντιμετώπιση της παχυσαρκίας.^{[99] [100] [101]}

8.2 Δομικά χαρακτηριστικά – Ικανότητα σχηματισμού μικκυλίων

Το CAGE είναι ένα διαυγές υποκίτρινο ιξώδες υγρό με τα αρχικά του συστατικά να είναι χαρακτηρισμένα ως GRAS (Generally Recognized As Safe) από τον Αμερικανικό Οργανισμό Φαρμάκων.^{[95] [103]}

Το γερανικό οξύ είναι υδρόφοβο μόριο, πρακτικά αδιάλυτο στο νερό, ενώ αντίθετα η χολίνη είναι υδρόφιλη. Αυτός ο διττός χαρακτήρας του CAGE το κάνει να έχει διαφορετική δομή ανάλογα με το υδατικό του περιεχόμενο. Η ύπαρξη νερού διακόπτει τη φυσική σύσταση και οργάνωση του ξηρού CAGE αναδιοργανώνοντας τις πολικές και μη πολικές περιοχές του, τις εναλλαγές ανιόντων-κατιόντων και τη γειτνίαση ατόμων.^[97] Να σημειωθεί ότι το CAGE έχει δομή ναοκλίμακας, η οποία παραμένει με την προσθήκη νερού.

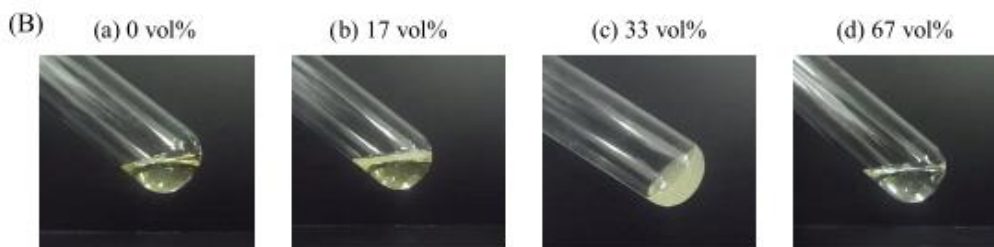
Το γερανικό οξύ και η χολίνη σχηματίζουν σύμπλοκο με ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση και δεσμούς υδρογόνου όταν το νερό απουσιάζει. Μάλιστα ο δεσμός υδρογόνου σχηματίζεται ανάμεσα στην καρβοξυλομάδα του γερανικού και την υδροξυλομάδα της χολίνης. Το νερό που προστίθεται τοποθετείται κοντά στις ομάδες αυτές διευκολύνοντας την ανταλλαγή πρωτονίου. Η καρβοξυλομάδα προσανατολίζεται προς τη χολίνη και το νερό χάριν ηλεκτροστατικό δυνάμεων με τη χολίνη και το υδρόφοβο κομμάτι του γερανικού οξέος δεν επηρεάζεται από το νερό.^[104]

Για υδατικό περιεχόμενο 0-17% κατ' όγκο, το μίγμα CAGE:νερό είναι υποκίτρινο διαυγές και γενικά, διατηρεί τη δομή του CAGE χωρίς το νερό. Με 17% νερό σχηματίζεται μια ετερογενής δομή με υδρόφιλα και υδρόφοβα τμήματα που δεν είναι όμως άκαμπτη. Όταν το υδατικό περιεχόμενο αρχίσει και υπερβαίνει το 25% κατ' όγκο, τότε δημιουργούνται λαμέλες. Οι μακρές υδρόφοβες ουρές του γερανικού συνδέονται με τα υδρόφιλα μόρια χολίνης που αποτελούν την πολική κεφαλή του CAGE. Έτσι, η χολίνη έρχεται σε επαφή και αλληλεπιδρά με το νερό, ενώ το υδρόφοβο γερανικό «κρύβεται» από το νερό δημιουργώντας μία στρωματοειδή φάση. Στη φάση λαμέλας το CAGE είναι θολό υποκίτρινο υγρό. Όταν η προσθήκη

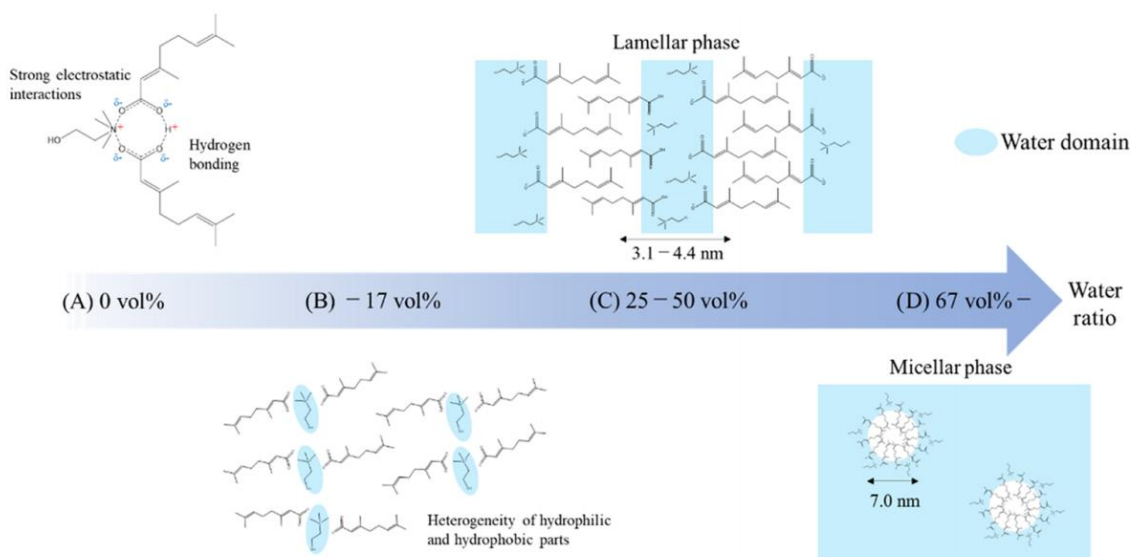
Χολίνη:Γερανικό οξύ - CAGE (Choline And GERanate or Choline And GERanic acid)

νερού υπερβεί το 67% κατ' όγκο, τότε το μίγμα είναι διάφανο και λαμβάνει τη δομή μικκυλίου, όπου οι υδρόφιλες κεφαλές (χολίνη) έρχονται σε επαφή με το νερό, ενώ οι υδρόφοβες ουρές (γερανικό) βρίσκονται εντός του μικκυλίου.^[104]

Όσον αφορά στο ιξώδες, η προσθήκη νερού το μειώνει σταδιακά έως ότου στο 25% κατ' όγκο νερό εμφανίζεται απότομη αύξηση του ιξώδους, το οποίο ελαττώνεται πάλι με περαιτέρω προσθήκη νερού.^[104]



Εικόνα 14. Οπτική διαφοροποίηση χρώματος CAGE με την προσθήκη 0, 17, 33, 67% κατ' όγκο νερό.^[104]



Εικόνα 15. Σχηματική αναπαράσταση των δομών που λαμβάνει το CAGE ανάλογα με το ποσοστό νερού. Ξεκινάει από την απλή αναδιάταξη των υδρόφιλων και υδρόφοβων κομματιών, μετά περνά στη φάση σχηματισμού λαμέλων και καταλήγει στη δημιουργία μικκυλίων για νερό πάνω από 67% κατ' όγκο.^[104]

Με βάση όλα τα παραπάνω το CAGE έχει τη δυναμική να γίνει πρωτοπόρο σύστημα μεταφοράς φαρμάκου. Όχι μόνο εμφανίζει αυξημένη ικανότητα διάλυσης των μη υδατοδιαλυτών βιοδραστικών ενώσεων, αλλά λειτουργεί προστατευτικά και ως φορέας για αυτές. Ειδικότερα, η δημιουργία μικκυλίων κάνει το CAGE να αποτελεί νανοφορέα για ενώσεις κατά τη χορήγησή τους στον -αποτελούμενο κατά βάση από νερό- ανθρώπινο οργανισμό. Έτσι,

Χολίνη:Γερανικό οξύ - CAGE (Choline And GERanate or Choline And GERanic acid)
είναι ίσως δυνατή η ανάπτυξη ενός ολοκληρωμένου νανοσυστήματος στοχευμένης και ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκων.

2. Πειραματικό Μέρος

Σκοπός Εργασίας

Η εργασία χωρίζεται σε τρία κύρια τμήματα με επιμέρους στόχους το καθένα.

Στο πρώτο τμήμα, ο σκοπός είναι ο σχεδιασμός και η σύνθεση πράσινων διαλυτών νέων ή ήδη απαντώμενων στη βιβλιογραφία. Οι πράσινοι αυτοί διαλύτες είναι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες και ιοντικά υγρά. Κυρίως, τα ιοντικά υγρά αξιολογούνται μέσω φασμάτων ^1H NMR και FT-IR. Ο χαρακτηρισμός γίνεται για τη διαπίστωση μεταφοράς πρωτονίου και για τη διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων που μπορεί να λαμβάνουν χώρα. Η μελέτη επικεντρώνεται στο CAGE (1:2) που είναι ένας πολλά υποσχόμενος διαλύτης. Ένας από τους βασικούς επιμέρους στόχους αυτού του μέρους της εργασίας, είναι η ανάπτυξη ενός νέου πράσινου διαλύτη με δομικά συστατικά ανάλογα του CAGE (1:2), του BAGE (1:3.5) (Βεταΐνη-Γερανικό οξύ). Συμπληρωματικός στόχος είναι η διερεύνηση της χρήσης των ιοντικών υγρών ως πλαστικοποιητές σε βιοσυμβατά φιλμ χιτοζάνης.

Στο δεύτερο τμήμα της εργασίας, ο σκοπός είναι η αξιοποίηση φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών καθώς και συμβατικών διαλυτών όπως η αιθανόλη και νερό για την εκχύλιση τζίντζερ. Στη συνέχεια, στόχο αποτέλεσε η ενσωμάτωση των εκχυλισμάτων σε βιοσυμβατά φιλμ χιτοζάνης και η μελέτη της αλληλεπίδρασης του βέλτιστου εκχυλίσματος και της σογκαόλης (ένα από τα κύρια συστατικά που περιέχονται στο τζίντζερ) με το DNA. Αρχικά, γίνεται χρήση των συντιθέμενων φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών, αιθανόλης και νερού για την εκχύλιση τζίντζερ ή θερμικά επεξεργασμένου είτε φρέσκου, για τη διαπίστωση της βέλτιστης. Έπειτα, χρησιμοποιούνται για υπερηχητική εκχύλιση ξηρού θερμικά επεξεργασμένου και εμπορικά διαθέσιμου τζίντζερ και τα προκύπτοντα εκχυλίσματα αξιολογούνται ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση και το φαινολικό φορτίο. Οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες και τα εκχυλίσματα αξιοποιούνται ως ενισχυτικά σε φιλμ χιτοζάνης και προσδιορίζονται χαρακτηριστικά των φιλμ, όπως βάρος, πάχος και διαπερατότητα σε υδρατμούς. Στη συνέχεια, διερευνάται η αλληλεπίδραση του DNA με το βέλτιστο εκχύλισμα, καθώς και με τη σογκαόλη ως μια από τις σημαντικότερες ενώσεις που περιλαμβάνονται στο τζίντζερ.

Στο τρίτο και τελευταίο κομμάτι της εργασίας, ο σκοπός είναι η αξιοποίηση του CAGE (1:2) στην ανάπτυξη διάφορων συστημάτων με την κουρκουμίνη. Πρώτος στόχος είναι η διερεύνηση της διαλυτότητας της κουρκουμίνης στο CAGE (1:2). Δεύτερος στόχος είναι η μελέτη της επίδρασης της παρουσίας CAGE (1:2) σε υδατικό μέσο για την αύξηση της υδατοδιαλυτότητας της κουρκουμίνης, με απώτερο σκοπό τη βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητάς της κουρκουμίνης. Τρίτο στόχο αποτελεί η ανάπτυξη ενός νανοσυστήματος CAGE (1:2) για τη

μεταφορά κourkouμίνης. Πάνω σε αυτό μελετάται ο εγκλεισμός της κourkouμίνης σε μικκύλια CAGE (1:2) σε υδατικό μέσο και ο χαρακτηρισμός τους ως προς την απόδοση διεργασίας και εγκλεισμού, το μέγεθος, το δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό. Συμπληρωματικός στόχος είναι η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης του CAGE (1:2).

Πειραματική Διαδικασία

2.1 Όργανα και Υλικά

Στους ακόλουθους πίνακες (πίνακας 4-πίνακας 5) καταγράφονται όλα τα όργανα, συσκευές και αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση και το χαρακτηρισμό των ιοντικών υγρών, των βαθέως ευτηκτικών υγρών, την εκχύλιση του τζίντζερ, τη δημιουργία φιλμ χιτοζάνης, τη μελέτη της αλληλεπίδρασης εκχυλίσματος με ct-DNA, τη μελέτη διαλυτότητας της κourkouμίνης και του εγκλεισμού και αποδέσμευσης αυτής. Προφανώς ο γενικής χρήσης εργαστηριακός εξοπλισμός (πχ ποτήρι ζέσης) χρησιμοποιήθηκε, αλλά για ευνόητους λόγους δε συμπεριλαμβάνεται στους πίνακες.

Πίνακας 4. Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν.

Συσκευή - Όργανο	Κατασκευαστής	Μοντέλο
Ζυγός ακριβείας (έως 210mg)	Kern	ADJ 200-4
Ζυγός ακριβείας (έως 2mg)	Sartorius	M2P
Μαγνητικός αναδευτήρας με θερμαινόμενη εστία	Witeg	MSH-20A
Αναδευτήρας τύπου Vortex	Velp	ZX4
Probe Υπερήχων	Sonics and Materials Inc	Vibra-Cell
Λουτρό Υπερήχων	Branson	2210 Ultrasonic Bath
Φυγόκεντρος	MSE	-
Υπερφυγόκεντρος	ThermoScientific	Sorvall LYNX 6000 Super-speed Centrifuge
Περιστροφικός εξατμιστήρας	Buchi	Waterbath B-480
Φίλτρο	Branchia	Nonsterile Syringe Filters, Pore: 0.22μm
Παχύμετρο (digital micrometer, 0-25mm)	Hogetex	-
Πεχάμετρο	Metrohm	744
Υδατόλουτρο	J.P. Selecta	Precisterm
Εκκολαπτήριο (Incubator)	Gallenkamp	-
Λυοφιλοποιητής	Lablyo Mini	Frozen In Time
Φασματοφωτόμετρο δειγματοφορέα πηγαδίων - Microplate Reader	Molecular Devices	SpectraMax 250

Φασματοφωτόμετρο UV-Vis	Jasco	V-770 UV-Vis/NIR
Φασματόμετρο FT-IR/AT-IR	Jasco	4200
Dynamic Light Scattering (DLS)	Malvern Panalytical	Zetasizer Nano ZS
NMR	Varian	V600MHz

Πίνακας 5. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν.

Αντιδραστήριο	Χημικός Τύπος	Παρασκευαστής-Προμηθευτής
Υπερκάθαρο-Απεσταγμένο-α-πιονισμένο νερό	H_2O	-
Αιθανόλη	C_2H_5OH	Sigma – Aldrich
Άνυδρη Βεταΐνη	$C_5H_{11}NO_2$	Alfa Aesar
Γαλακτικό οξύ (υδατικό διάλυμα 80% v/v)	$C_3H_6O_3$	Labbox
Γλυκόζη	$C_6H_{12}O_6$	Sigma – Aldrich
Γλυκερόλη	$C_3H_8O_3$	Penta
Οξικό οξύ	CH_3CO_2H	Vioryl
DPPH	$C_{18}H_{13}N_5O_6$	Aldrich
Ανθρακικό Νάτριο	Na_2CO_3	Penta
Folin-Ciocalteu	-	Merck Millipore
Χιτοζάνη χαμηλού μοριακού βάρους (5-20mPa·s)	$C_{56}H_{103}N_9O_{39}$	Tokyo Chemical Industry CO.
Τζίντζερ Ξηρό-Φρέσκο	-	-
Υδροξυχολίνη (υδατικό διάλυμα 46%v/v)	$C_5H_{15}NO_2$	Alfa Aesar
Λεβουλικό οξύ (98%)	$C_5H_8O_3$	Alfa Aesar
Δωδεκανοϊκό οξύ	$C_{12}H_{24}O_2$	Fluka
Βανιλικό οξύ	$C_8H_8O_4$	Fluka
Όξινη ανθρακική χολίνη (υδατικό διάλυμα 80% v/v)	$C_5H_{14}NO \cdot HCO_3$	Sigma – Aldrich
Γερανικό οξύ (98%)	$C_{10}H_{16}O_2$	Alfa Aesar
Κουρκουμίνη		Flyorochem
Μονόξινο φωσφορικό κάλιο/Φωσφορικό δικάλιο	K_2HPO_4	Penta
Δισόξινο φωσφορικό Κάλιο/Φωσφορικό μονοκάλιο	KH_2PO_4	Penta
Βρωμιούχο κάλιο	KBr	Sigma – Aldrich
DNA Βοδινού Θύμου - ct-DNA (Deoxyribonucleic acid sodium salt from calf thymus)	-	Alfa Aesar

2.2 Σύνθεση Πράσινων Διαλυτών

Το υποκεφάλαιο αυτό αφορά στις μεθόδους και τα υλικά σύνθεσης και χαρακτηρισμού των ιοντικών υγρών και των βαθέως ευτηκτικών διαλυτών που πραγματεύεται η εργασία. Ορισμένοι διαλύτες είναι γνωστοί στη βιβλιογραφία, άλλοι αρχίζουν να κεντρίζουν το ενδιαφέρον το τελευταίο διάστημα και άλλοι συντίθενται για πρώτη φορά (BAGE (1:3.5)). Σκοπός, λοιπόν, είναι η σύνθεση NADESs για την εκχύλιση τζίντζερ και την παρασκευή βιοσυμβατών φιλμ χιτοζάνης, καθώς επίσης ο σχεδιασμός και η σύνθεση νέων διαλυτών είτε για πρώτη φορά (BAGE (1:3.5) είτε διαλυτών που βρίσκονται σε πολύ πρώιμο στάδιο μελέτης (CAGE (1:1), CAGE (1:2)))

2.2.1 Σύνθεση Ιοντικών Υγρών

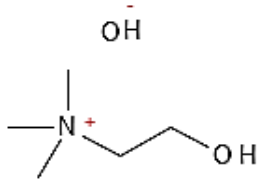
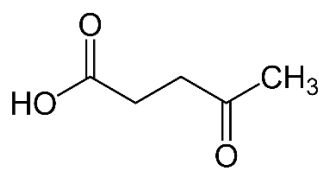
Η σύνθεση ιοντικών υγρών περιλαμβάνει την στάγδην προσθήκη υπό ψύξη και αδρανείς συνθήκες του οξέος στη βάση με ταυτόχρονη ανάδευση του προκύπτοντος ιοντικού υγρού. Οι αδρανείς συνθήκες επιτυγχάνονται με την απουσία οξυγόνου και τη δημιουργία ατμόσφαιρας αζώτου, ενώ η ψύξη επιτυγχάνεται με τη χρήση πάγου.

Ιοντικό Υγρό 1: Ιοντικό Υγρό χολίνης και λεβουλικού οξέος

Προστίθενται 2mL (8.15mmol) υδατικού διαλύματος υδροξυχολίνης (46% wt) σε σφαιρική φιάλη, η οποία τοποθετείται σε πάγο. Στη φιάλη εφαρμόζεται διαχωριστική χοάνη εξισορρόπησης πίεσης στην οποία προστίθενται 946μL (8.15mmol) λεβουλικού οξέος, ενώ με τη χρήση μπαλονιού γεμάτο με άζωτο δημιουργούνται αδρανείς συνθήκες. Στάγδην γίνεται η προσθήκη του οξέος με παράλληλη ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα. Η προσθήκη αυτών των ποσοτήτων έγινε ώστε το ιοντικό υγρό που προκύπτει να έχει αναλογία moles 1:1 ανάμεσα στην υδροξυχολίνη και το λεβουλικό οξύ. Όταν η ανάμιξη ολοκληρωθεί και η αντίδραση έχει λάβει τέλος και έπειτα από 24 ώρες, το προκύπτον ιοντικό υγρό μεταφέρεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα όπου υπό κενό εξατμίζεται τόσο το νερό που προϋπάρχει στα αρχικά αντιδραστήρια, αλλά και αυτό που παράγεται από την αντίδραση. Το ιοντικό υγρό ονομάζεται CH:LevA (1:1) ή IY_1 και φυλάσσεται σε ξηραντήρα.

Πίνακας 6. Η μοριακή αναλογία και οι συντακτικοί τύποι των ιόντων που αποτελούν τα συστατικά του ιοντικού υγρού υδροξυχολίνης και λεβουλικού οξέος.

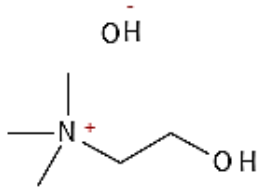

IY_1	Μοριακή αναλογία	Συστατικό 1	Συστατικό 2
--------	------------------	-------------	-------------

CH:LevA	1:1	 <p>Υδροξυχολίνη</p>	 <p>Λεβουλινικό οξύ</p>
---------	-----	--	--

Ιοντικό υγρό 2: Υδροξυχολίνη και δωδεκανοϊκό οξύ

Για την παρασκευή του δεύτερου ιοντικού υγρού ακολουθείται η ίδια διαδικασία. Εδώ προστίθενται στη σφαιρική φιάλη 0.245mL (1mmol) υδατικού διαλύματος υδροξυχολίνης. Το δωδεκανοϊκό ή λαυρικό οξύ είναι στερεό και ζυγίζονται 200mg (1mmol) αυτού τα οποία διαλύονται σε 1mL αιθανόλης και στο τέλος εισέρχονται στη διαχωριστική χοάνη. Με την εξάτμιση υπό κενό εκτός του νερού εξατμίζεται και η αιθανόλη (σχηματίζοντα αζεοτροπικό μίγμα με το νερό). Οι ποσότητες αυτές έχουν και πάλι υπολογιστεί ώστε η αναλογία οξέος-βάσης να είναι 1:1 κατά mole. Το τελικό ιοντικό υγρό ονομάζεται CH:Lauric (1:1) ή IL_2 και φυλάσσεται σε ξηραντήρα.

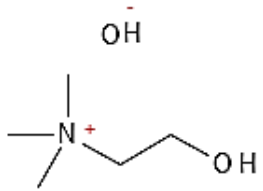
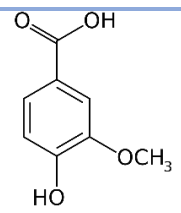
Πίνακας 7. Η μοριακή αναλογία και οι συντακτικοί τύποι των ιόντων που αποτελούν τα συστατικά του ιοντικού υγρού υδροξυχολίνης και δωδεκανοϊκού οξέος.

IL_2	Μοριακή αναλογία	Συστατικό 1	Συστατικό 2
CH:Lauric	1:1	 <p>Υδροξυχολίνη</p>	 <p>Δωδεκανοϊκό οξύ</p>

Ιοντικό υγρό 3: Υδροξυχολίνη και βανιλικό οξύ

Ομοίως ακολουθείται η ίδια διαδικασία. Εδώ προστίθενται 0.292mL (1.19mmol) υδατικού διαλύματος υδροξυχολίνης και 200mg βανιλικού οξέος (1.19mmol) αφού πρώτα έχουν διαλυθεί σε 2.5mL αιθανόλης. Οι ποσότητες αυτές αντιστοιχούν σε αναλογία οξέος-βάσης 1:1 κατά mole. Το τελικό ιοντικό υγρό ονομάζεται CH:VanA (1:1) ή IL_3 και φυλάσσεται σε ξηραντήρα.

Πίνακας 8. Η μοριακή αναλογία και οι συντακτικοί τύποι των ιόντων που αποτελούν τα συστατικά του ιοντικού υγρού υδροξυχολίνης και βανιλικού οξέος.

IY_3	Μοριακή αναλογία	Συστατικό 1	Συστατικό 2
CH:VanA	1:1	 <p>Υδροξυχολίνη</p>	 <p>Βανιλικό οξύ</p>

2.2.2 Σύνθεση Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών Φυσικής Προέλευσης (NADESs)

Γενική μέθοδος σύνθεσης βαθέως ευτηκτικών διαλυτών.

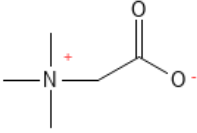
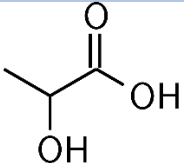
Για την παρασκευή των DESs, στη συγκεκριμένη περίπτωση NADESs, ζυγίζονται οι απαιτούμενες ποσότητες των αρχικών συστατικών σε ζυγό ακριβείας. Αφού, λοιπόν, τα επιμέρους συστατικά ζυγιστούν μεταφέρονται σε σφαιρική φιάλη, αναμιγνύονται και στη συνέχεια, αναδεύονται σε μαγνητικό αναδευτήρα με παράλληλη ήπια θέρμανση (στους 40°C). Η ανάδευση και η θέρμανση συνεχίζονται έως ότου σχηματιστεί ένα τελικό διαυγές ρευστό χωρίς υπολείμματα των αρχικών συστατικών. Μετά την ολοκλήρωση της παρασκευής αποθηκεύεται σε ξηραντήρα για την αποφυγή προσρόφησης υγρασίας.

1. Βεταΐνη:Γαλακτικό οξύ:Νερό (1:2:2.5) (Bet:LA:W)

Η γραμμομοριακή αναλογία είναι 1 προς 2 για τη βεταΐνη και το γαλακτικό οξύ αντίστοιχα. Αυτό σημαίνει ότι με βάση τα υπάρχοντα αντιδραστήρια για τα 12mL υδατικού διαλύματος (80% wt) γαλακτικού οξέος (64.4mmol) προστίθενται 7.547g βεταΐνη (0.129mol), αναμιγνύονται και θερμαίνονται στους 40°C. Τελικά, ο NADESs περιέχει νερό από το αρχικό διάλυμα γαλακτικού οξέος. Ο συγκεκριμένος NADES δε λυοφιλοποιείται και χρησιμοποιείται ως έχει.

Πίνακας 9. Η μοριακή αναλογία και οι συντακτικοί τύποι του δέκτη και δότη δεσμών υδρογόνου του NADES Bet:LA (1:2).

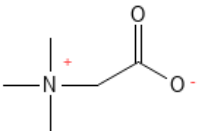
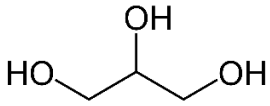
NADES (χωρίς νερό)	Μοριακή αναλογία	Δέκτης Δεσμών Υδρογόνου	Δότης Δεσμών Υδρογόνου
--------------------	------------------	-------------------------	------------------------

Bet:LA	1:2	 <p>Βεταΐνη</p>	 <p>Γαλακτικό οξύ</p>
---------------	-----	---	--

2. Βεταΐνη:Γλυκερόλη (1:3) (Bet:Gly)

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής, ζυγίζονται 10g βεταΐνη (85.4mmol) και προστίθενται σε 18.716mL (0.171mol).

Πίνακας 10. Η μοριακή αναλογία και οι συντακτικοί τύποι του δέκτη και δότη δεσμών υδρογόνου του NADES Bet:Gly (1:3).

NADES	Μοριακή αναλογία	Δέκτης Δεσμών Υδρογόνου	Δότης Δεσμών Υδρογόνου
Bet:Gly	1:3	 <p>Βεταΐνη</p>	 <p>Γαλακτικό οξύ</p>

3. Βεταΐνη:Γλυκερόλη:Νερό (1:3:1) (Bet:Gly:W)

Η παρασκευή του γίνεται με προσθήκη νερού κατά τη σύνθεση. Ζυγίζονται 10g βεταΐνη (85.4mmol) και προστίθενται σε 18.716mL (0.256mol). Επίσης, προστίθενται 1.537g υπερκάθαρο νερό (85.4mmol) και ακολουθεί ανάδευση και θέρμανση στους 40°C.

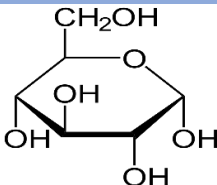
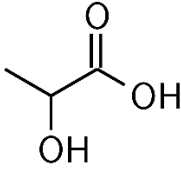
4. Βεταΐνη:Γλυκερόλη:Νερό (1:3:3.33) (Bet:Gly:W)

Η παρασκευή του γίνεται με προσθήκη νερού μετά τη σύνθεση του καθαρού Bet:Gly (1:3). Ζυγίζονται 6.557g Bet:Gly (1:3) και προστίθεται 1g υπερκάθαρο νερό και ακολουθεί ανάδευση. Η δημιουργία αυτού του DES έγινε γιατί το (Bet:LA:W) έχει αναλογία ξηρού μέρους (Bet:LA) προς το νερό 1.2:1. Έτσι, έγινε και συντέθηκε το (Bet:Gly):W με αναλογία 1.2:1, ώστε να είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους.

5. Γλυκόζη:Γαλακτικό Οξύ:Νερό (1:5:6.2) (Glu:LA:W)

Αρχικά, ζυγίζονται 5g D-γλυκόζης (27.8mmol) και προστίθενται σε 12.899mL υδατικού διαλύματος (80% κατά βάρος) γαλακτικού οξέος (0.139mol οξέος). Το μίγμα αναδεύεται για 4 ώρες υπό θέρμανση στους 60°C μέχρι να ομογενοποιηθεί.

Πίνακας 11. Η μοριακή αναλογία και οι συντακτικοί τύποι του δέκτη και δότη δεσμών υδρογόνου του NADES *Glu:LA* (1:5).

NADES (χωρίς νερό)	Μοριακή αναλογία	Δέκτης Δεσμών Υδρογόνου	Δότης Δεσμών Υδρογόνου
<i>Glu:LA</i>	1:5	 Γλυκόζη	 Γαλακτικό οξύ

Πίνακας 12. Συστατικά και θερμοκρασία παρασκευής των NADESs.

NADES	Συστατικό 1	Συστατικό 2	Συστατικό 3	Μοριακή αναλογία	Θέρμανση (°C)
Bet:LA:W	Βεταΐνη	Γαλακτικό οξύ	Νερό	1:2:2.5	40
Bet:Gly	Βεταΐνη	Γλυκερόλη	Νερό	1:3	40
Bet:Gly:W2	Βεταΐνη	Γλυκερόλη	Νερό	1:3:1	40
Bet:Gly:W3	Βεταΐνη	Γλυκερόλη	Νερό	1:3:3.33	40
Glu:LA	Γλυκόζη	Γαλακτικό οξύ	Νερό	1:5:6.2	40

Ο χαρακτηρισμός της αντιοξειδωτικής δράσης των NADESs έγινε μέσω της οξείδωσης της ρίζας DPPH όπως θα περιγραφεί παρακάτω στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων.

2.2.3 Σύνθεση CAGE

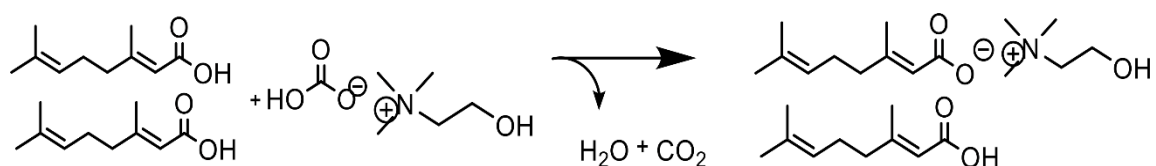
Η σύνθεση αφορά και στο CAGE 1:1 και στο CAGE 1:2.

2.2.3.1 CAGE 1:1

Το CAGE 1:1 είναι το καθαρό ιοντικό υγρό. Σε ένα μπουκαλάκι εισάγονται 998μL γερανικού οξέος (5.665mmol οξέος) και στη συνέχεια, προστίθεται σταδιακά 1mL υδατικού διαλύματος όξινης ανθρακικής χολίνης (80% κατά βάρος) (5.665mmol χολίνης). Οι ποσότητες αυτές υπολογίζονται ώστε η γραμμομοριακή αναλογία να είναι 1:1 ανάμεσα στα αρχικά συστατικά. Κατά την ανάμιξη το μίγμα αναδεύεται και τελείται η αντίδραση μεταφοράς πρωτονίου με σχηματισμό νερού και διοξειδίου του άνθρακα υπό μορφή φυσαλίδων. Μπορεί να γίνει πρόσθεση του οξέος στη χολίνη και αντίστροφα, αλλά προτιμάται να γίνεται πρόσθεση της χολίνης στο γερανικό οξύ ώστε να αποφεύγεται ο έντονος αφρισμός του μίγματος. Το μίγμα αφήνεται σε ανάδευση και όταν πια δεν παράγονται φυσαλίδες τότε η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί. Στη συνέχεια, το προκύπτον ιοντικό υγρό οδηγείται σε λυοφιλίωση για να απομακρυνθεί το περιεχόμενο νερό. Η αποθήκευση γίνεται σε ξηραντήρα για να μην τελειάει προσρόφηση υγρασίας.

2.2.3.2 CAGE 1:2

Η διαδικασία είναι η ίδια με το CAGE 1:1 και το μόνο που αλλάζει είναι οι ποσότητες των αντιδραστηρίων. Για κάθε 1mL υδατικού διαλύματος όξινης ανθρακικής χολίνης (5.665mmol) προστίθενται 1.996mL γερανικού οξέος (11.33mmol οξέος) και η τελική γραμμομοριακή αναλογία είναι 1:2 αντίστοιχα. Ο χαρακτηρισμός της αντιοξειδωτικής δράσης έγινε μέσω της οξείδωσης της ρίζας DPPH, όπως θα περιγραφεί σε επόμενο στάδιο στο κεφάλαιο της εκχύλισης.



Σχήμα 13. Αντίδραση σχηματισμού του CAGE 1:2.

2.2.4 Σύνθεση BAGE – Βεταΐνης και Γερανικού

Στην παρούσα εργασία γίνεται σύνθεση για πρώτη φορά του BAGE (Betaine And GERanic). Η ιδέα ανέκυψε για την διεύρυνση της κατηγορίας διαλυτών που ομοιάζουν στο CAGE.

Η εύρεση της «κατάλληλης» γραμμομοριακής αναλογίας έγινε με σταδιακή μελέτη διάφορων αναλογιών. Ζυγίζονται 100mg βεταΐνης (0.854mol) σε ζυγό ακριβείας και αυτά αναμιγνύονται με 525μL γερανικού οξέος (2.988mol). Παράλληλα το μίγμα αναδεύεται και θερμαίνεται ήπια στους 40°C μέχρι το σχηματισμό διαυγούς υποκίτρινου ρευστού. Δηλαδή για κάθε γραμμάριο βεταΐνης χρειάζονται 5.25mL γερανικού οξέος. Η αναλογία αυτή αντιστοιχεί σε 1 mole βεταΐνης και 3.5moles γερανικού οξέος. Συνεπώς, στην παρούσα εργασία γίνεται για πρώτη φορά σύνθεση του BAGE (1:3.5).



Εικόνα 16. BAGE σε μοριακή αναλογία 1:3.5.

2.2.5 Δομικός χαρακτηρισμός των συντιθέμενων διαλυτών

Ο δομικός χαρακτηρισμός ορισμένων άνωθι καταγεγραμμένων διαλυτών φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (^1H NMR) και με φασματοσκοπία υπέρυθρου (FT-IR).

Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός

Η καταγραφή των φασμάτων πρωτονίου (^1H) NMR έχει πραγματοποιηθεί με τα όργανα Varian 300 MHz και 600 MHz. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO- d_6). Οι τιμές των μετατοπίσεων μετρώνται σε ppm ως προς τη συχνότητα συντονισμού του τετραμεθυλοσιλανίου (TMS) και η πολλαπλότητα των σημάτων αναφέρεται ως s (singlet, απλό), d (double, διπλό), t (triple, τριπλό), q (quartet, τετραπλό), m (multiplet, πολλαπλό), br (broad, ευρύ), dd (doublet of doublets, διπλή διπλών), tt (triplet of triplets, τριπλή τριπλών) και td (triplet of doublets, τριπλή διπλών). Οι σταθερές συζεύξεως (J) δίνονται σε Hz.

Πίνακας 13. Διαλύτες για τους οποίους λήφθηκε ^1H NMR.

Κωδικός	Αναλυτικά
<i>IL</i>₁	CH:LevA (1:1)
<i>IL</i>₃	CH:VanA (1:1)
CAGE 1:2	Choline bicarbonate 1: Geranic acid 2
CAGE 1:1	Choline bicarbonate 1: Geranic acid 1
BAGE	Betaine 1: Geranic acid 3.5
Geranic acid	Pure
Betaine	Pure

Φασματοσκοπία υπέρυθρου FT-IR

Μικρή ποσότητα δείγματος –μία σταγόνα– λειοτριβείται με ξηρό βρωμιούχο κάλιο (KBr) έως ότου προκύψει ένα ομοιογενές μίγμα. Με χρήση πρέσας 10tn μικρή ποσότητα του μίγματος γίνεται παστίλια και μελετάται η αλληλεπίδρασή του δείγματος με την υπέρυθη ακτινοβολία στο εύρος 4000-400 cm^{-1} . Η φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier αφορά στους διαλύτες που δεν έχουν ξαναμελετηθεί και όχι στους NADESs που έχουν μελετηθεί και σε άλλες πειραματικές δοκιμές. Τα φάσματα FT-IR καταγράφηκαν σε φασματογράφο JASCO 4200.

Πίνακας 14. Διαλύτες που μελετήθηκαν μέσω FT-IR.

Κωδικός	Αναλυτικά
<i>IL</i>₁	CH:LevA (1:1)
CAGE 1:2	Choline bicarbonate 1: Geranic acid 2
CAGE 1:1	Choline bicarbonate 1: Geranic acid 1

BAGE	Betaine 1: Geranic acid 3.5
-------------	-----------------------------

2.3 Εκχύλιση Τζίντζερ με NADESs – Αλληλεπίδραση εκχυλισμάτων και σογκαόλης με ct-DNA – Ενισχυμένα με εκχύλιση Φιλμ Χιτόζανης

Σκοπός αυτού του πειραματικού μέρους είναι η μελέτη της εκχύλισης ξηρού και φρέσκου τζίντζερ με φυσικούς βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες. Αφότου ευρεθεί ο βέλτιστος διαλύτης με βάση της αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος, τότε το εκχύλιμα του διαλύτη και ο διαλύτης χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό ενισχυμένων φιλμ χιτοζάνης. Τέλος, μελετάται η αλληλεπίδραση της καθαρής 6-σογκαόλης και του βέλτιστου εκχυλίσματος με το DNA θύμου μόσχου.

2.3.1 Εκχύλιση τζίντζερ με NADESs και υπερήχους

Γενική διαδικασία εκχύλισης

Σε ζυγό ακριβείας ζυγίζονται 3g συνολικού διαλύτη ή διαλύτη και νερού και στη συνέχεια, 200 ή 120g τζίντζερ. Ακολουθεί ανάμιξη του τζίντζερ και του διαλύτη και ύστερα το σύστημα υπόκειται σε εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους. Αρχικά, ορίζεται ο καθαρός χρόνος εκχύλισης, η ενέργεια που θα λειτουργεί το σύστημα των υπερήχων και η ύπαρξη παλμού κατά τη διάρκεια της εκχύλισης. Δηλαδή όταν ο παλμός είναι ανοιχτός τότε το σύστημα υπερήχων μεταδίδει υπερηχητικά κύματα στο προς εκχύλιση μίγμα, ενώ όταν ο παλμός είναι κλειστός δε μεταδίδεται κύμα. Αφότου οριστούν οι συνθήκες της εκχύλισης, το probe υπερήχων εμβαπτίζεται εντός του μίγματος. Επειδή οι υπερήχοι αυξάνουν τη θερμοκρασία εντός του μίγματος και οι βιοδραστικές ενώσεις είναι θερμοευαίσθητες γίνεται χρήση πάγου γύρω από το μίγμα ώστε να διατηρείται σε χαμηλή θερμοκρασία απορροφώντας την περίσσεια θερμότητας. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι οι Bet:LA:W, Bet:Gly, Bet:Gly:W, Glu:LA:W, νερό, αιθανόλη και διάλυμα νερού:αιθανόλης (70-30% v/v). Μάλιστα σε κάποιους διαλύτες έγινε επιπλέον προσθήκη νερού πριν την εκχύλιση.

Η πρώτη ύλη που εκχυλίζεται είναι τζίντζερ σε τρεις μορφές:

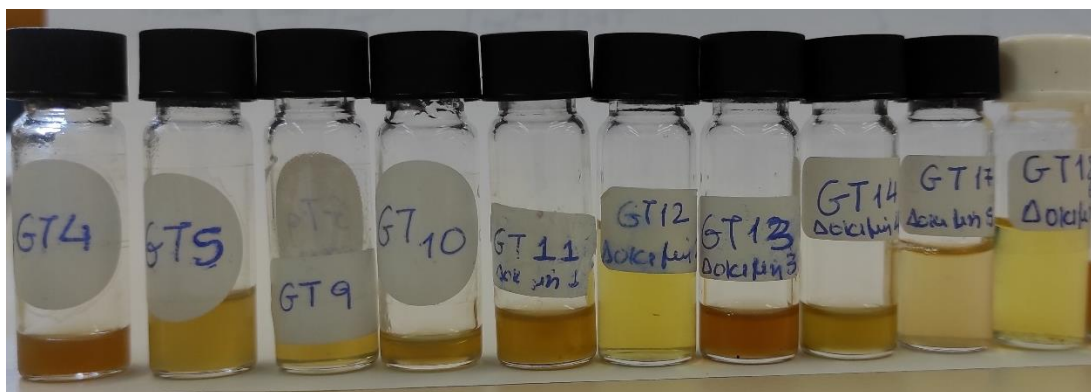
1. Ξηρό θερμικά επεξεργασμένο τζίντζερ εμπορίου (πούδρα)
2. Φρέσκο τριμμένο και φυσικά ξηραμένο (από τον αέρα) τζίντζερ
3. Φρέσκο τριμμένο και φυσικά ξηραμένο (από τον αέρα) τζίντζερ που κοκκοποιήθηκε σε τελικό μέγεθος κόκκου 212nm.

Οι συνθήκες αφορούν σε δύο σειρές εκχύλισης και καταγράφονται στον πίνακα 15.

Πίνακας 15. Συνθήκες και πρώτες ύλες εκχύλισης.

Κωδικός	NADES/EtOH		H ₂ O		Τζίντζερ		<i>g</i> _{Solvent}	Time		Power	Παλμός	
	Είδος	mg	mg	Είδος	mg	<i>g</i> _{Ginger}	min	sec	Watt	On (sec)	Off (sec)	
GT ₁	Bet: LA: W	2400	600	1	200	15	10	-	120	6	3	
GT ₂	Bet: LA: W	2400	600	2	200	15	10	-	120	6	3	
GT ₃	Bet: LA: W	3000	-	2	200	15	10	-	120	6	3	
GT ₄	Bet: LA: W	3000	-	3	200	15	10	-	120	6	3	
E/Bet: LA: W	Bet: LA: W	3000	-	1	120	25	23	8	60	2	2	
E/Glu: LA: W	Glu: LA: W	3000	-	1	120	25	23	8	60	2	2	
E/Bet: Gly	Bet: Gly	3000	-	1	120	25	23	8	60	2	2	
E/Bet: Gly: W(1:3:1)	Bet: Gly: W(1:3:1)	3000	-	1	120	25	23	8	60	2	2	
E/Bet: Gly: W(1:3:3.33)	Bet: Gly: W(1:3:3.33)	3000	-	1	120	25	23	8	60	2	2	
E/EtOH: H ₂ O	EtOH	1944	1056	1	120	25	23	8	60	2	2	
E/H ₂ O	-	-	3000	1	120	25	23	8	60	2	2	
E/EtOH	EtOH	3000	-	1	120	25	23	8	60	2	2	

Μετά το πέρας της εκχύλισης, το εκχύλισμα φυγοκεντρείται ώστε να κατακαθίσει το στερεό τζίντζερ. Μετά τη φυγοκέντρωση το υπερκείμενο υγρό διηθείται με απλό διηθητικό χαρτί, ώστε να παραληφθεί σε καθαρό vial (μπουκαλάκι) το εκχύλισμα. Η αποθήκευση γίνεται στο ψυγείο ή στην κατάψυξη για πιο μακρά διατήρηση.



Εικόνα 17. Τα εκχυλίσματα από αριστερά προς τα δεξιά: GT₁, GT₂, GT₃, GT₄, E/Bet: LA: W, E/EtOH: H₂O, E/Bet: Gly, E/Glu: LA: W, E/H₂O, E/EtOH.

2.3.2 Χαρακτηρισμός Αντιοξειδωτικής Δράσης Εκχυλισμάτων – NADESs – CAGE 1:2

Μία πολύ βασική παράμετρος των εκχυλισμάτων είναι η αντιοξειδωτική τους δράση. Στα εκχυλίσματα υπάρχει πληθώρα αντιοξειδωτικών ουσιών που έχουν απομονωθεί από το τζίντζερ. Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης γίνεται και για τους NADESs των εκχυλισμάτων για να διαπιστωθεί εάν συνεισφέρουν στην δράση και έχει γίνει και έλεγχος της αντιοξειδωτικής δράσης του CAGE 1:2.

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης γίνεται μέσω της αναγωγής της ρίζας DPPH. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή η ρίζα DPPH• (2,2-δι-(4-tert-οκτυλφαινυλο)-1-πυκρλυδραζιλιο) είναι ιδιαίτερα δραστική και αλληλεπιδρά με τις αντιοξειδωτικές ενώσεις του εκχυλίσματος ή των διαλυτών και ανάγεται. Η αναγωγή της ρίζας μεταφράζεται και σε αλλαγή χρώματος από μωβ προς κίτρινο. Η μεταβολή του χρώματος ανιχνεύεται με το φασματοφωτόμετρο UV-Vis Microplate Reader.

Αρχικά, ζυγίζονται 5mg της ρίζας DPPH και διαλύονται σε αιθανόλη σε τελικό όγκο διαλύματος 50mL. Η ρίζα είναι φωτοευαίσθητη οπότε φυλάσσεται σε απόλυτα σκοτεινό μέρος και παρασκευάζεται τη μέρα των μετρήσεων για να αποφευχθεί η αναγωγή που προκύπτει με τη φύλαξη αρκετών ωρών.

Υστερα, πραγματοποιείται λήψη και ζύγιση 20μL ή 40μL του εκάστοτε εκχυλίσματος, τα οποία αραιώνονται με αιθανόλη σε τελικό όγκο 1000μL συγκέντρωσης $C_0 = 0.02$ ή $0.04 \mu\text{L}/\mu\text{L}$ αντίστοιχα.

Στη συνέχεια, από τα διαλύματα της αρχικής συγκέντρωσης C_0 παρασκευάζονται με αιθανόλη διαλύματα αραιότερων συγκεντρώσεων εκχυλίσματος απευθείας στο plate. Με τελικό όγκο διαλύματος εκχυλίσματος 100μL παρασκευάζονται διαλύματα συγκέντρωσης $C_0, 0.8C_0, 0.6C_0, 0.4C_0, 0.2C_0$. Σε όλα αυτά τα διαλύματα προστίθενται και 100μL διαλύματος ρίζας DPPH. Επίσης, παρασκευάζονται και τα τυφλά δείγματα που αποτελούνται αποκλειστικά από 200μL διαλύματος DPPH, αποκλειστικά από 200μL αιθανόλης και από δείγμα κατ' όγκου σύστασης 50% αιθανόλης και 50% διαλύματος DPPH και τελικό όγκο 200μL. Στην επόμενη εικόνα αναπαρίσταται η παραπάνω διαδικασία. Το plate αφήνεται σε μέρος χωρίς φως να επωαστεί και λαμβάνονται μετρήσεις απορρόφησής των δειγμάτων σε μήκος κύματος 515nm.

Πίνακας 16. Τρόπος πλήρωσης του plate με τα δείγματα.

ο πίνακας είναι της μορφής (μL)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
DPPH	100	100	100	200	200	200	0	0	0	0	0	0
EtOH	100	100	100	0	0	0	200	200	200	0	0	0
stock	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B (4)												
DPPH	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
EtOH	0	0	20	20	40	40	60	60	60	80	80	80
stock	100	100	80	80	60	60	40	40	40	20	20	20
C (6)												
DPPH	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
EtOH	0	0	20	20	40	40	60	60	60	80	80	80
stock	100	100	80	80	60	60	40	40	40	20	20	20
D (7)												
DPPH	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
EtOH	0	0	20	20	40	40	60	60	60	80	80	80
stock	100	100	80	80	60	60	40	40	40	20	20	20
E (9)												
DPPH	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
EtOH	0	0	20	20	40	40	60	60	60	80	80	80
stock	100	100	80	80	60	60	40	40	40	20	20	20
F (DES)												
DPPH	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
EtOH	0	0	20	20	40	40	60	60	60	80	80	80
stock	100	100	80	80	60	60	40	40	40	20	20	20

Το αρχικό διάλυμα C_0 παρασκευάζεται με 20μL για τα GT_1, GT_2, GT_3, GT_4 και με 40μL για τα υπόλοιπα εκχυλίσματα.

Μετά τη λήψη των τιμών απορρόφησης υπολογίζεται η % αναστολή (αναγωγή) της ρίζας για κάθε συγκέντρωση εκχυλίσματος και σχεδιάζεται το διάγραμμα της επί τοις εκατό αναστολής της ρίζας συναρτήσει της συγκέντρωσης. Η ποσοστιαία μετατόπιση προκύπτει από:

$$\% Inhibition = \frac{A_{blank} - A_{sample}}{A_{blank}} * 100$$

Όπου A_{blank} η τιμή απορρόφησης του διαλύματος 50% κατ' όγκο αιθανόλη και 50% κατ' όγκο διαλύματος DPPH και A_{sample} η τιμή της απορρόφησης των δειγμάτων που περιέχουν εκχύλισμα. Ουσιαστικά τα δείγματα περιέχουν ένα μέρος εκχυλίσματος σε σχέση με το τυφλό που δεν περιέχει καθόλου εκχύλισμα.

Η προκύπτουσα γραφική παράσταση είναι ευθεία γραμμή με θετική κλίση της μορφής:

$$\%Inhibition = a * C + b \quad (i)$$

Ορίζεται ως IC_{50} η συγκέντρωση διαλύματος εκχυλίσματος που απαιτείται για 50% μείωση της συγκέντρωσης της ρίζας DPPH. Επομένως, η εξίσωση (i) μετατρέπεται ως εξής:

$$50 = a * IC_{50} + b \rightarrow IC_{50} = \frac{50 - b}{a}$$

Όπου a η κλίση και b η αποτέμνουσα της ευθείας.

Η συγκέντρωση IC_{50} έχει μονάδες μέτρησης $\frac{\mu l_{\text{εκχυλίσματος}}}{ml_{\text{δείγματος}}}$. Καθώς όμως οι αρχικές ποσότητες του εκχυλίσματος έχουν ζυγιστεί το IC_{50} μπορεί πλέον να δοθεί και σε $\frac{mg_{\text{εκχυλίσματος}}}{ml_{\text{δείγματος}}}$.

2.3.3 Προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών Εκχυλισμάτων (Total Phenolic Compound – TPC)

Κατά την εκχύλιση του τζίντζερ πολύτιμες φαινολικές ενώσεις μεταφέρονται στο διαλύτη. Ο προσδιορισμός του φαινολικού αυτού φορτίου βασίζεται στη μέθοδο Folin-Ciocalteu.

Αρχικά η ένωση αναφοράς είναι το γαλλικό οξύ για το οποίο δημιουργείται καμπύλη αναφοράς μέσω της απορρόφησής του σε μήκος κύματος $\lambda=755\text{nm}$. Η προκύπτουσα εξίσωση είναι η ακόλουθη:

$$C_{galliac\ acid} \left[\frac{mg_{galliac}}{L} \right] = 0.686A_{galliac\ acid} + 0.0134, \quad R^2 = 0.9969$$

Στη συνέχεια, λαμβάνονται 100μL εκχυλίσματος, τα οποία παράλληλα ζυγίζονται, και αραιώνονται με 100μL υπερκάθαρο νερό. Από το αραιωμένο δείγμα εκχυλίσματος μεταφέρονται σε ένα μπουκαλάκι 50μL και προστίθενται 3mL υπερκάθαρο H_2O και αναδεύονται για ομογενοποίηση. Στη συνέχεια προστίθενται 250μL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu και ακολουθεί επώαση 2 λεπτών. Έπειτα, προστίθενται 750μL κορεσμένου διαλύματος Na_2CO_3 (ως ρυθμιστής του pH) και ανακινούνται με χρήση Vortex. Τέλος, προστίθενται 950μL υπερκάθαρου νερού και τα δείγματα αφήνονται για 1 ώρα επώαση καλυμμένα και σε σκοτεινό σημείο. Με την ίδια διαδικασία παρασκευάζεται τυφλό δείγμα με υπερκάθαρο νερό στη θέση του εκχυλίσματος. Η διαδικασία γίνεται εις διπλούν για κάθε δείγμα και δίνεται προσοχή ώστε όλη η διαδικασία να τελεστεί σε σκοτεινό σημείο γιατί το Folin-Ciocalteu είναι φωτοευαίσθητο. Η ύπαρξη φαινολικών δηλώνεται από την απόκτηση μπλε χρώματος του επεξεργασμένου δείγματος, η απορρόφηση του οποίου μετράται σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος $\lambda=755\text{nm}$.

Η πραγματική απορρόφηση των δειγμάτων με εκχύλισμα είναι A.

$$A = A_{sample} - A_{blank}$$

Όπου A_{sample} η τιμή της απορρόφησης του δείγματος με εκχύλισμα και A_{blank} η τιμή για το τυφλό.

Μέσω της εξίσωσης του γαλλικού η τιμή της απορρόφησης των δειγμάτων μετατρέπεται σε συγκέντρωση γαλλικού οξέος. Αν θεωρηθεί ότι ο όγκος του διαλύτη είναι ο όγκος του εκχυλίσματος, τότε τα ολικά φαινορικά που εκχυλίζονται ανά γραμμάριο τζίντζερ δίνονται από τη σχέση:

$$TPC \left[\frac{mg_{gallic}}{g_{ginger}} \right] = \frac{C_{gallic\ acid} \left[\frac{mg_{gallic}}{L_{extr}} \right] * V_{extr}(L_{extr})}{m_{ginger}(g_{ginger})}$$

Οι τιμές που προκύπτουν αφορούν στο μέσο όρο από τις μετρήσεις για κάθε δείγμα.

2.3.4 Αλληλεπίδραση ct-DNA με σογκαόλη και εκχύλισμα τζίντζερ

Αρχικά, παρασκευάζεται buffer (ρυθμιστικό διάλυμα) Tris-HCl (10mM). Ζυγίζονται 605.7mg Tris, διαλύονται σε 500mL υπερκάθαρου νερού και με προθήκη σταγόνων HCl (10%v/v) ρυθμίζεται το pH στο 7.4.

Σε ζυγό ακριβείας ζυγίζεται μικρή ποσότητα του αντιδραστηρίου DNA θύμου αδένος μόσχου (ct-DNA) και οι ίνες αραιώνονται με την αντίστοιχη ποσότητα υπερκάθαρου νερού ώστε να προκύψει τελικό διάλυμα ct-DNA συγκέντρωσης $C_0 = 1 \text{ mg/mL}$. Το διάλυμα αυτό αφήνεται σε ανάδευση και επωάζεται για 24 ώρες σε θερμοκρασία 4°C. Μετά το πέρας της επώασης από το διάλυμα αρχικής συγκέντρωσης C_0 παρασκευάζονται, με το buffer, διαλύματα συγκεντρώσεων 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500 mg/L. Παράλληλα, ελέγχεται ώστε η απορρόφηση στα 260nm να είναι 1.8-1.9 φορές υψηλότερη από ότι στα 280nm, κάτι που δηλώνει πως το DNA είναι απαλλαγμένο από πρωτεΐνες και δεν έχει επιμολυνθεί.

Επίσης, ζυγίζεται ποσότητα εκχυλίσματος E/Bet:LA:W (1mg) και καθαρής 6-σογκαόλης (1mg) και διαλύονται με αιθανόλη (1mL) σε τελική συγκέντρωση διαλύματος 1mg/mL. Ακολουθούν τρεις σειρές μετρήσεων.

Για την πρώτη σειρά εισάγονται 900μL από κάθε συγκέντρωση τελικού διαλύματος ct-DNA σε φιαλίδια. Σε κάθε φιαλίδιο με διάλυμα DNA προστίθενται 100μL του διαλύματος εκχυλίσματος (τελική συγκέντρωση εκχυλίσματος $C_f=0.1\text{mg/mL}$), αναδεύονται σε Vortex και εισάγονται σε «εκκολαπτήριο» (incubator) στους 37°C για 5 λεπτά ώστε να προσομοιάζονται οι συνθήκες του ανθρώπινου οργανισμού. Μετά το πέρας της επώασης μετράται η απορρόφηση των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis και διερευνάται η μετατόπιση της κορυφής του ct-DNA που υποδηλώνει αλληλεπίδραση με το εκχύλισμα. Μετά από διερεύνηση οι κατάλληλες συγκεντρώσεις ct-DNA για αυτή την ποσότητα εκχυλίσματος είναι οι άνω των 50mg/L.

Για τη δεύτερη σειρά μετρήσεων εισάγονται 990μL από κάθε συγκέντρωση τελικού διαλύματος ct-DNA σε φιαλίδια. Σε κάθε φιαλίδιο με διάλυμα ct-DNA προστίθενται 10μL του διαλύματος εκχυλίσματος (τελική συγκέντρωση εκχυλίσματος $C_i=0.01\text{mg/mL}$) και ακολουθεί η ίδια διαδικασία με την πρώτη σειρά.

Η τρίτη σειρά μετρήσεων είναι ίδια με τη δεύτερη μόνο που αντί για διάλυμα εκχυλίσματος προστίθεται διάλυμα 6-σογκαόλης συγκέντρωσης 1mg/mL. Και στις τρεις σειρές ενδεχομένως χρησιμοποιούνται και διαφορετικοί συνδυασμοί ποσοτήτων εκχυλίσματος-ct-DNA ανάλογα με τα αποτελέσματα που προκύπτουν.

2.3.5 Φιλμ χιτοζάνης ενισχυμένα με NADES και εκχύλισμα τζίντζερ

Στην υποενότητα αυτή θα περιγραφεί ο τρόπος παρασκευής φιλμ χιτοζάνης (Chitosan = CS) ενισχυμένα με ιοντικά υγρά (IL_1 , CAGE 1:2), με NADES (Bet:LA:W) και με εκχύλισμα τζίντζερ. Για τη σύνθεση φιλμ, αρχικά, ζυγίζεται η ποσότητα για κατάλληλη περιεκτικότητα (w/v) ιοντικού υγρού, βαθέως ευτηκτικού διαλύτη ή εκχυλίσματος και αραιώνεται με υπερκάθαρο νερό σε τελικό όγκο διαλύματος 100mL. Κατ' αυτό τον τρόπο παρασκευάζονται υδατικά διαλύματα διαφόρων περιεκτικότητας σε ιοντικό υγρό, NADES ή εκχύλισμα και μετράται το pH ώστε να είναι αρκετά όξινο για να διαλυθεί η χιτοζάνη. Στη συνέχεια, ζυγίζονται 200mg (0.2% w/v) χιτοζάνης χαμηλού μοριακού βάρους και προστίθενται στο υδατικό διάλυμα που έχει παρασκευαστεί. Ακολουθεί ανάδευση για να διαλυθεί η χιτοζάνη και ο απαιτούμενος χρόνος ποικίλει ανάλογα με το διάλυμα. Μετά την ολοκλήρωση της διάλυσης, προστίθενται από 45mL διαλύματος σε κρυσταλλωτήρια διαμέτρου 60mm (Φ60). Τα κρυσταλλωτήρια μεταφέρονται σε υδατόλουτρο στο οποίο θερμαίνονται υπό χαμηλή θερμοκρασία (40°C) για 2 ημέρες έως ότου να εξατμιστεί το περιεχόμενο νερό και να σχηματιστεί το φιλμ. Μετά την πλήρη εξάτμιση του νερού, τα φιλμ απομακρύνονται από το υδατόλουτρο και με τη χρήση τσιμπίδας αποκολλώνται προσεκτικά από το κρυσταλλωτήριο και αποθηκεύονται σε ξηραντήρα. Ορισμένα φιλμ πριν την αποκόλλησή τους εισήχθησαν σε φούρνο στους 40°C μέχρι σταθερού βάρους για να φύγει τυχούσα υγρασία.

Σε ορισμένα υδατικά διαλύματα το pH δεν ήταν ικανοποιητικά όξινο με αποτέλεσμα η χιτοζάνη να παραμένει αδιάλυτη. Σε αυτά έγινε προσθήκη οξικού οξέος ή λεβουλινικού οξέος πριν ή μετά την προσθήκη του πλαστικοποιητή και της χιτοζάνης. Ακολουθεί σύνοψη στον πίνακα 17.

Πίνακας 17. Συνθήκες και αντιδραστήρια παρασκευής φιλμ χιτοζάνης.

Κωδικός	Πλαστικοποιητής		Περιεκτικότητα πλαστικοποιητή %w/v	Περιεκτικότητα χιτοζάνης %w/v	Οξικό Οξύ %v/v	Λεβουλιλικό Οξύ %v/v	Διάμετρος κρυσταλλωτηρίου (mm)	Όγκος προσθήκης στο κρυσταλλωτήριο (mL)	Εισαγωγή στο φούρνο
		Στάδιο Προσθήκης							
<i>F</i> ₁	-	-	-	0.2	1	-	60	45	-
<i>F</i> ₂	Bet:LA:W	APXH	1	0.2	-	-	60	45	-
<i>F</i> ₃	Bet:LA:W	APXH	3	0.2	-	-	60	45	-
<i>F</i> ₄	Bet:LA:W	APXH	6	0.2	-	-	60	45	-
<i>F</i> ₅	Bet:LA:W	APXH	10	0.2	-	-	60	45	-
<i>F</i> ₆	Bet:LA:W	APXH	0.5	0.2	-	-	60	45	✓
<i>F</i> ₇	Bet:LA:W	APXH	3	0.2	-	-	60	45	✓
<i>F</i> ₈	<i>E/Bet: LA: W</i>	APXH	0.5	0.2	-	-	60	45	✓
<i>F</i> ₉	<i>E/Bet: LA: W</i>	APXH	1	0.2	-	-	60	45	✓
<i>F</i> ₁₀	GT1	APXH	1	0.2	-	-	60	45	-
<i>F</i> ₁₁	<i>E/Bet: Gly</i>	APXH	0.5	0.2	-	-	60	45	✓
<i>F</i> ₁₂	<i>E/Glu: LA: W</i>	APXH	0.5	0.2	-	-	60	45	✓
<i>F</i> ₁₃	<i>IL</i> ₁	APXH	1	0.2	-	1	60	45	-
<i>F</i> ₁₄	<i>IL</i> ₁	ΤΕΛΟΣ	1	0.2	1 (ΣΤΗΝ APXH)	-	60	45	-
<i>F</i> ₁₅	CAGE 1:2	APXH	1	0.2	-	-	60	45	-
<i>F</i> ₁₆	CAGE 1:2	ΤΕΛΟΣ	1	0.2	-	-	60	45	-

Έγιναν 3-4 επαναλήψεις σε κάθε φιλμ και λαμβάνεται ο μέσος όρος για τις ιδιότητες που θα προσδιοριστούν έπειτα.

Χαρακτηρισμός Φιλμ

1. Φασματοσκοπία ATR – FT-IR

Πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός των εκχυλισμάτων και των φιλμ με χρήση φασματοσκοπίας υπερύθρου με την τεχνική της αποσβένουσας ολικής ανάκλασης. Μικρό κομμάτι φιλμ (1cm²) επαφίεται στον υποδοχέα κρύσταλλο με χρήση μοχλού. Έτσι, μπορούν τα φιλμ να συγκριθούν με τα εκχυλίσματα που δρουν ως ενισχυτές.

2. Μέτρηση βάρους

Σε ζυγό ακριβείας ζυγίζεται κάθε κρυσταλλωτήριο ενώ αρχικά περιέχει το εκάστοτε φιλμ ($m_{\text{κρυσταλ+φιλμ}}$). Έπειτα, το φιλμ αποκολλάται και ζυγίζεται πάλι το κρυσταλλωτήριο χωρίς το φιλμ ($m_{\text{κρυσταλ}}$). Η μάζα του φιλμ που παραλήφθηκε υπολογίζεται από τη διαφορά των προηγούμενων ζυγίσεων σύμφωνα με τον τύπο:

$$m_{\text{φιλμ}} = m_{\text{κρυσταλ+φιλμ}} - m_{\text{κρυσταλ}}$$

Κατόπιν ζυγίζεται και το φιλμ όπως αποκολλήθηκε για επιβεβαίωση του αποτελέσματος.

3. Μέτρηση πάχους

Με τη χρήση παχύμετρου Hogotex μετράται αρχικά το πάχος της μεμβράνης ($d_{\text{μεμβρ}}$) που θα χρησιμοποιηθεί για να αποφευχθεί η καταστροφή του φιλμ. Ύστερα, το κάθε φιλμ εισάγεται στη μεμβράνη και μετράται πάλι το συνολικό πάχος της μεμβράνης και του φιλμ ($d_{\text{μεμβρ+φιλμ}}$). Το πάχος του φιλμ υπολογίζεται ως η διαφορά των δύο προηγούμενων μετρήσεων. Λαμβάνονται πολλαπλές μετρήσεις (άνω των 6) κάθε φορά, ώστε να απαλειφθεί το σφάλμα της τοπικής ανομοιογένειας πάχους που μπορεί να υπάρχει στο φιλμ.

$$d_{\text{φιλμ}} = d_{\text{μεμβρ+φιλμ}} - d_{\text{μεμβρ}}$$

4. Μέτρηση διαπερατότητας υδρατμών

Η διαπερατότητα υδρατμών των φιλμ μετράται με μια τροποποίηση της πρότυπης μεθόδου ASTM 2016 (βάσει του Standard Test Method for Water Vapor Transmission of Materials). Αντί για κρυσταλλωτήριο θα χρησιμοποιηθεί μικρό μπουκαλάκι (vial) με επιφάνεια διατομής 2.5cm² στο οποίο προστίθενται 3mL απεσταγμένο νερό. Στο στόμιο του σκεύους

τοποθετείται κόλλα και προσκολλάται το φιλμ, ενώ προστίθεται και επιπλέον parafilm για να είναι πλήρως σφραγισμένο και το νερό να διέρχεται μόνο μέσω του φιλμ στο στόμιο. Το σύστημα ζυγίζεται την χρονική στιγμή δημιουργίας του ($t_0 = 0$) και τοποθετείται σε ξηραντήρα που έχει έρθει σε ισορροπία και η υγρασία είναι RH=0%. Λαμβάνονται ζυγίσεις στην

πρώτη, δεύτερη ώρα, στην πρώτη μέρα και μετά το πέρας μίας εβδομάδας. Τα αποτελέσματα της ζυγίσαις αποτυπώνονται γραφικά σε σχέση με το χρόνο και άρα λαμβάνεται ο ρυθμός μεταφοράς υδρατμών (Water Vapor Transmission Rate).

$$WVTR = \frac{\alpha}{A} \left[\frac{g}{m^2 * min} \right]$$

Όπου α η κλίση της ευθείας της συνάρτησης βάρους σε σχέση με το χρόνο και A (m^2) το εμβαδό διατομής του φιλμ από το οποίο μπορεί να διέλθουν οι υδρατμοί.

Η διαπερατότητα των υδρατμών υπολογίζεται από τη σχέση:

$$WaterVaporPermeability \left[\frac{g}{min * m * Pa} \right] = WVTR * \frac{d_{\text{φιλμ}}}{\Delta P}$$

Όπου $d_{\text{φιλμ}}$ το πάχος του φιλμ σε m και ΔP η διαφορά πίεσης μεταξύ των δύο επιφανειών του φιλμ που ισούται με 2339Pa σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Τέλος, το ποσοστό μάζας που έχει διαπεράσει το φιλμ σε κάθε χρονική στιγμή t_i είναι:

$$\Pi\% = \frac{m_{\text{συστήματος για } t=0} - m_{\text{συστήματος για } t_i}}{m_{\text{συστήματος για } t=0}} * 100$$

Όπου η μάζα αφορά σε όλη τη διάταξη που έχει δημιουργηθεί.

2.4 Μελέτη διαλυτότητας και εγκλεισμού κουρκουμίνης στο CAGE 1:2

Σκοπός της συγκεκριμένης υποενότητας είναι η δημιουργία καμπύλης διαλυτότητας της κουρκουμίνης σε διαλύτη CAGE 1:2 και ο εγκλεισμός αυτής σε σωματίδια CAGE 1:2.

2.4.1 Μελέτη διαλυτότητας κουρκουμίνης σε CAGE 1:2

Αρχικά, έγινε δοκιμή της ικανότητας του CAGE να διαλύει την κουρκουμίνη και τα αποτελέσματα ήταν άκρως ενθαρρυντικά και υποσχόμενα. Οπότε αποφασίστηκε να γίνει μελέτη της διαλυτότητας με δημιουργία καμπύλης διαλυτότητας.

Σε ζυγό ακριβείας και σε μικρά μπουκαλάκια ζυγίζονται 700μL CAGE και στη συνέχεια, ζυγίζονται διαφορετικές ποσότητες κουρκουμίνης. Όταν ολοκληρωθούν οι ζυγίσαις, σε κάθε μπουκαλάκι με CAGE προστίθεται από μία ζυγισμένη ποσότητα κουρκουμίνης και ακολουθεί ήπια ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα. Όλη η διαδικασία τελείται υπό σκοτάδι και τα μπουκαλάκια τυλίγονται με αλουμινοχαρτό, καθώς η κουρκουμίνη είναι ευοξειδωτή με το φως. Μόλις ολοκληρωθεί η διαλυτοποίηση, τα δείγματα φιλτράρονται με τη χρήση Syringe Filters 0.22μm. Μικρή ποσότητα δείγματος αραιώνεται κατάλληλα με αιθανόλη και

λαμβάνονται τα φάσματα απορρόφησης στο εύρος 350-200nm. Από τις μετρήσεις αυτές σχηματίζεται η καμπύλη διαλυτότητας κουρκουμίνης στο CAGE. Στον πίνακα 18 δίνονται οι περιεκτικότητες της κουρκουμίνης στο διαλύτη.

Πίνακας 18. Συγκεντρώσεις δειγμάτων σε κουρκουμίνη.

Κωδικός	Αναλογία $\frac{\text{Curcumin}}{\text{CAGE 1:2}}$
	$\frac{m_{g_{cur}}}{g_{CAGE\ 1:2}}$
Cage_cur/5	5.02
Cage_cur/10	10.75
Cage_cur/16.5	16.52
Cage_cur/24	23.75
Cage_cur/31	30.99

Επιπλέον, έγιναν δοκιμές με υπέρκορα σε κουρκουμίνη διαλύματα CAGE, ώστε να προσδιοριστεί η ικανότητα διάλυσης του CAGE.

2.4.2 Διάγραμμα διαλυτότητας φάσεων (Phase Solubility)

Σε περιέκτες (vials) παρασκευάζονται διαλύματα από ρυθμιστικό διάλυμα (K_2HPO_4 - KH_2PO_4) με pH=7.4 και CAGE (1:2) σε τελικές συγκεντρώσεις CAGE (1:2) 0-900mmol/L. Στη συνέχεια, προστίθεται περίσσεια κουρκουμίνης. Τα τελικά αυτά διαλύματα επωάζονται στους 37°C για δύο μέρες σε συνθήκες σκότους και υπό ήπια ανάδευση. Έπειτα, το υπερκείμενο υγρό φιλτράρεται με φίλτρο πόρων 0.22μm και προσδιορίζεται η απορρόφησή του με UV-Vis φασματοφωτόμετρο.^[107]

2.4.3 Μελέτη εγκλεισμού της κουρκουμίνης στο CAGE 1:2

Όπως έχει σημειωθεί και στο θεωρητικό μέρος, το CAGE περιέχει υδρόφιλα και υδρόφοβα μέρη και σε παρουσία νερού άνω του 66% κατ' όγκο σε διάλυμα CAGE-νερού σχηματίζει μικκύλια. Τώρα γίνεται ο εξής συνδυασμός, το CAGE είναι πολύ καλός διαλύτης της κουρκουμίνης και παρουσία περίσσειας νερού σχηματίζει μικκύλια στα οποία μπορεί να εγκλειστεί η κουρκουμίνη που είναι υδρόφοβη.

Πρώτα, ζυγίζεται συγκεκριμένη ποσότητα CAGE (1.500g) και στη συνέχεια ζυγίζεται κατάλληλη ποσότητα κουρκουμίνης, η οποία διαλύεται στο CAGE με ανάδευση. Αφότου τα διαλύματα έχουν συντεθεί, τότε προστίθεται κατάλληλη ποσότητα νερού ώστε η περιεκτικότητα σε νερό να είναι 67% κατ' όγκο. Οι συγκεντρώσεις κουρκουμίνης στο διάλυμα του CAGE

επιλέχθηκαν με βάση τα αποτελέσματα που ανέκυψαν από τη μελέτη διαλυτότητας και δίνονται στον πίνακα 19. Έπειτα, το σύστημα νερού-CAGE-κουρκουμίνης αφήνεται σε ανάδευση για 2 μέρες. Μετά το πέρας αυτών, το σύστημα λυοφιλοποιείται ώστε να εξαχνωθεί το νερό και να μείνουν πίσω τα σωματίδια που σχηματίστηκαν.

Πίνακας 19. Τα αρχικά διαλύματα CAGE-κουρκουμίνης στα οποία προστέθηκε νερό και ύστερα, λυοφιλοποιήθηκαν και αποτελούν τη βάση για τη μελέτη του εγκλεισμού (encapsulation).

Κωδικός	Αναλογία $\frac{\text{Curcumin}}{\text{CAGE 1:2}}$
	$\frac{m_{g_{cur}}}{g_{\text{CAGE 1:2}}}$
Micelles_Blank	0
Micelles_Cage_cur/5	5.45
Micelles_Cage_cur/20	20.33

2.4.4 Χαρακτηρισμός σωματιδίων CAGE-κουρκουμίνης

1. Χαρακτηρισμός μεγέθους, κατανομής μεγέθους και ζ-δυναμικού

Ο χαρακτηρισμός του μεγέθους, του δείκτη πολυδιασποράς (κατανομή μεγέθους) και του ζ-δυναμικού έγινε μέσω της μεθόδου Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS). Λαμβάνονται 10μL από τα δείγματα, αραιώνονται με 20mL υπερκάθαρο νερό και αναδεύονται για πολύ μικρό χρονικό διάστημα με Vortex προκειμένου να γίνει η ανάμιξη και να επιτευχθεί καλύτερη διασπορά των σωματιδίων. Με χρήση σύριγγας προστίθεται το εκάστοτε δείγμα στην κυψελίδα τύπου U (DTS1070) μέχρι την πλήρη διαβροχή των ηλεκτροδίων της και εν τέλει, εισάγεται στο όργανο Zetasizer Nano ZS. Με τη χρήση του κατάλληλου λογισμικού και των αρχείων SOP (Standard Operating Procedure) λαμβάνονται οι μετρήσεις του μεγέθους των νανοσωματιδίων, του δείκτη πολυδιασποράς και του ζ-δυναμικού.

Για το μέγεθος σωματιδίων και το δείκτη πολυδιασποράς τελούνται 6 σαρώσεις (μετρήσεις) και για το ζ-δυναμικό 3 σαρώσεις. Λαμβάνεται ο μέσος όρος των μετρήσεων και υπολογίζεται η τυπική απόκλιση.

2. Χαρακτηρισμός σωματιδίων μέσω FT-IR

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι αυτή που περιγράφεται στην Παράγραφο 2.2.5 και έχει γίνει για τα ιοντικά υγρά. Τελείται για τα δείγματα εγκλεισμού, το τυφλό δείγμα, το φορέα (CAGE (1:2)) και την προς εγκλεισμό ένωση (κουρκουμίνη). Αξιολογώντας τις διαφορές ανάμεσα στα φάσματα των δειγμάτων προκύπτουν πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του CAGE (1:2) και της κουρκουμίνης, επιβεβαιώνοντας τον επιτυχή εγκλεισμό της.

3. Χαρακτηρισμός απόδοσης εγκλεισμού

Κάθε δείγμα ζυγίζεται πριν την έναρξη της διαδικασίας εγκλεισμού και ύστερα, από τη λυοφιλοποίηση. Έτσι, μπορεί να προσδιοριστεί η απόδοση διεργασίας:

$$\% \text{ Απόδοση διεργασίας} = \frac{\text{Συνολική μάζα σωματιδίων που συλλέχθηκε (mg)}}{\text{Αρχική μάζα συστατικών (mg)}} * 100$$

Σε περιέκτη μεταφέρονται 200μL από κάθε λυοφιλοποιημένο δείγμα, τα οποία παράλληλα ζυγίζονται. Αυτά αναμιγνύονται με 1500μL αιθανόλης και ο περιέκτης -αφού σφραγιστεί- οδηγείται σε λουτρό υπερήχων στους 50°C για μία ώρα με σκοπό να «σπάσουν» τα σωματίδια και να απελευθερωθεί η όποια κουρκουμίνη έχει εγκλειστεί. Έτσι, η συνολική κουρκουμίνη απελευθερώνεται στο δείγμα και προσδιορίζεται μέσω UV-Vis φασματοφωτόμετρου. Στη συνέχεια, γίνεται αναγωγή της υπολογισθείσας κουρκουμίνης στα αρχικά σωματίδια που παραλήφθηκαν μετά τη λυοφιλοποίηση και προσδιορίζεται η απόδοση εγκλεισμού μέσω του τύπου:

$$\% \text{ Απόδοση Εγκλεισμού} = \frac{\text{Μάζα κουρκουμίνης που εγκλείστηκε (mg)}}{\text{Αρχική κουρκουμίνη προς εγκλεισμό (mg)}} * 100$$

Έπειτα, αφότου υπολογιστεί η συνολική εγκλεισμένη κουρκουμίνη, πρέπει να υπολογιστεί η μη εγκλεισμένη κουρκουμίνη. Γι' αυτό, λαμβάνονται 200μL από κάθε δείγμα, στα οποία προστίθεται 1mL ρυθμιστικού υδατικού διαλύματος pH=7.4 και το μίγμα φυγοκεντρείται στις 28000 στροφές για 40 λεπτά. Το υπερκείμενο που περιέχει τη μη εγκλεισμένη κουρκουμίνη φασματοφωτομετρείται και υπολογίζεται η ποσότητα της κουρκουμίνης.

3. Αποτελέσματα και Συζήτηση

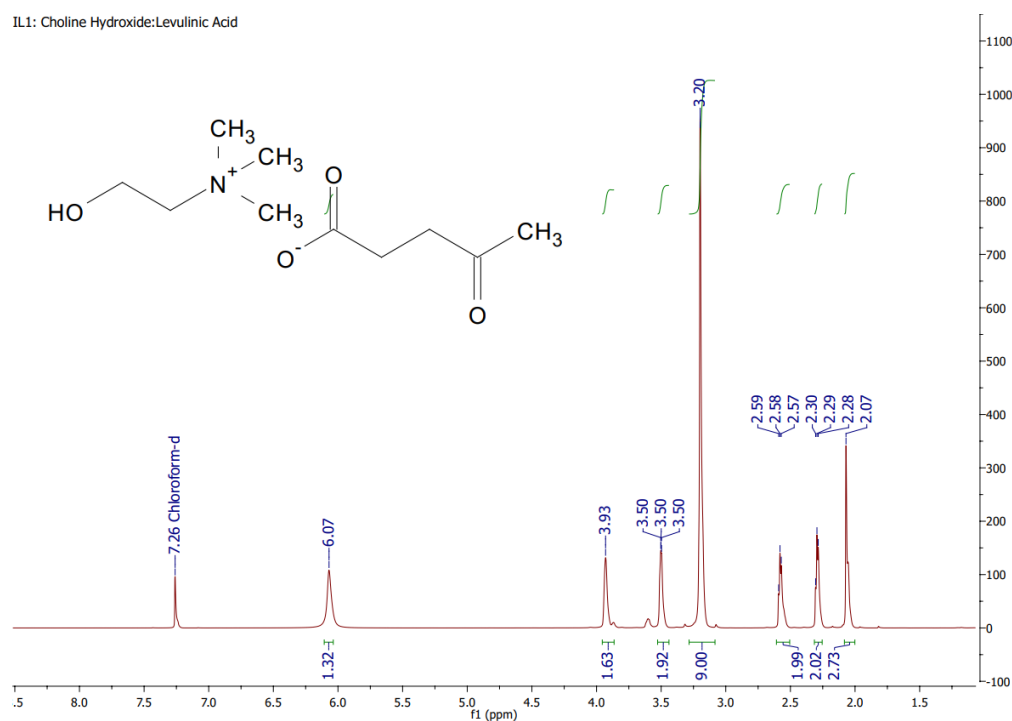
3.1 Χαρακτηρισμός των συντιθέμενων διαλυτών

Ο χαρακτηρισμός των διαλυτών αφορά σε φάσματα ^1H NMR και FT-IR. Παρακάτω αναλύονται τα φάσματα για το ιοντικό υγρό Choline Hydroxide:Levulinic Acid (1:1), το CAGE 1:2 και το BAGE 1:3.5.

3.1.1. Φασματοσκοπία πυρηνικού συντονισμού (^1H NMR) και φασματοσκοπία υπερύθρου (FT-IR)

3.1.1.1 Ιοντικό Υγρό Χολίνης-Λεβουλινικού οξέος (1:1)

Τα επιμέρους συστατικά του ιοντικού υγρού είναι αναγνωρισμένα ως ασφαλή (GRAS, Generally Recognised as Safe) από τον Αμερικανικό Οργανισμό Φαρμάκων.^[114] Το ιοντικό υγρό που προκύπτει είναι ένα ιξώδες και διαυγές ρευστό χρώματος καφέ-κόκκινου και παραμένει υγρό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το φάσμα που ανακύπτει αποτυπώνεται στο Γράφημα 1.



Γράφημα 1. Φάσμα ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) του ιοντικού υγρού ΙΥ₁.

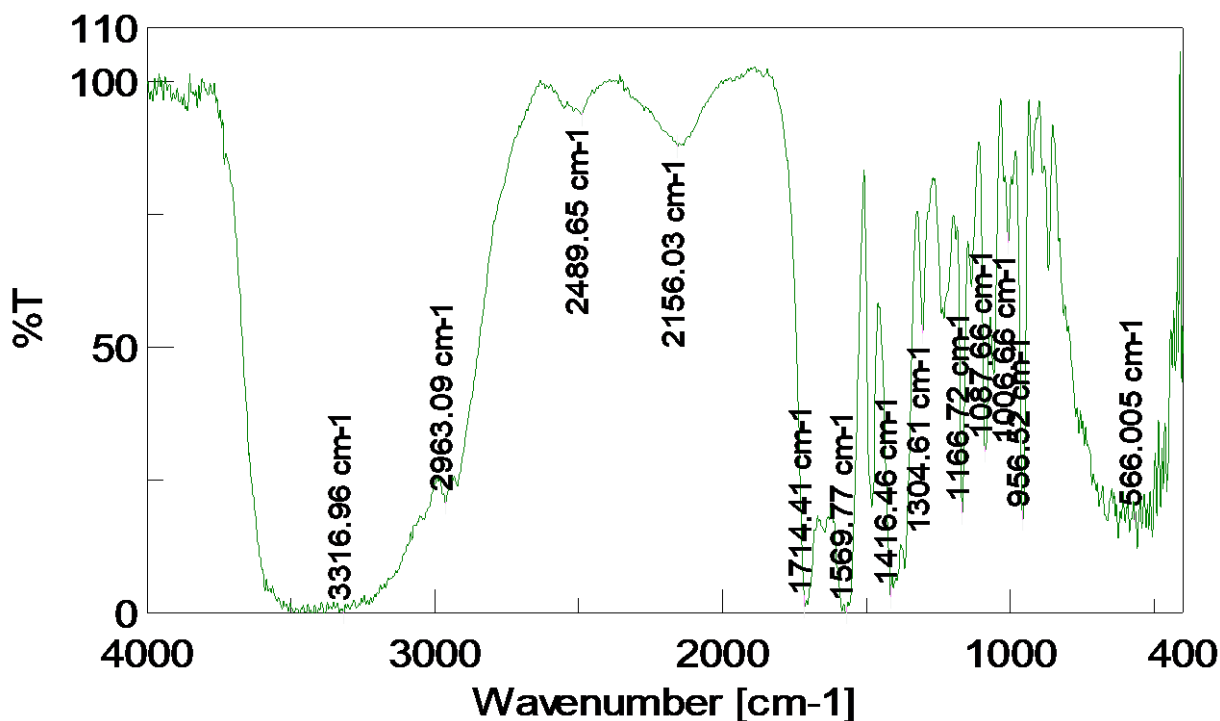
Η συχνότητα του οργάνου NMR για τη λήψη του φάσματος είναι 600MHz και ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε είναι το δευτεριωμένο χλωροφόρμιο CDCl_3 . Κάθε κορυφή του φάσματος ^1H NMR αντιστοιχεί σε ισοδύναμα πρωτόνια με το ίδιο χημικό περιβάλλον και τα οποία συντονίζονται στην ίδια συχνότητα. Όταν ένα πρωτόνιο έχει n γειτονικά πρωτόνια, τότε το σήμα που δίνει σχάζεται δίνοντας πολλαπλή κορυφή που μάλιστα αποτελείται από $n+1$ επιμέρους κορυφές ($n+1$ πολλαπλότητα). Οι επιμέρους κορυφές χαρακτηρίζονται από τη σταθερά σύζευξης J και οι ομάδες πρωτονίων που συζεύγουν μεταξύ τους θα πρέπει εμφανίζουν την ίδια τιμή σταθεράς J . Ο διαλύτης δίνει κορυφή στα 7.26ppm.

Από το φάσμα προκύπτει: ^1H NMR (CDCl_3), δ : 6.07 (s, 1H, $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 3.93 (br, 2H, $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 3.50 (t, $J=3.0$, 2H, $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 3.20 (brs, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 2.58 (t, $J=6$, 2H, $\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$), 2.30 (t, $J=6$, 2H, $\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$), 2.07 (brs, 3H, $\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$).

Ξεκινώντας από τα χαμηλότερα μαγνητικά πεδία, δηλαδή από τα πιο αποπροστατευμένα πρωτόνια (αριστερό μέρος φάσματος), η κορυφή στα 6.07ppm αντιστοιχεί ενδεχομένως στο μοναδικό πρωτόνιο της υδροξυλομάδας της χολίνης, το οποίο εμφανίζεται αριστερότερα από το αναμενόμενο και μπορεί να αποτελεί απόρροια των αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα ανάμεσα στο ανιόν και το κατιόν του ιοντικού υγρού. Η ευρεία κορυφή που εμφανίζεται στα 3.93ppm ολοκληρώνεται για 2 πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια του μεθυλενίου που βρίσκεται γειτονικά του οξυγόνου της χολίνης. Η κορυφή στα 3.50ppm αντιστοιχεί στα πρωτόνια του μεθυλενίου που συνδέεται με το άζωτο της χολίνης και είναι ελάχιστα λιγότερο αποπροστατευμένα σε σχέση με τα προηγούμενα πρωτόνια. Η κορυφή είναι τριπλή, γιατί τα πρωτόνια γειτνιάζουν με τα δύο πρωτόνια του άνθρακα που συνδέεται με το υδροξύλιο. Στη συνέχεια, η κορυφή στα 3.20ppm αντιστοιχεί στα πρωτόνια των μεθυλίων της χολίνης που συνδέονται με το άζωτο. Τα πρωτόνια αυτά έχουν ίδιο χημικό περιβάλλον, συνεπώς, συντονίζονται στην ίδια συχνότητα και αποτυπώνονται στο ίδιο μαγνητικό πεδίο όλα μαζί δίνοντας ισχυρό σήμα και ευρεία κορυφή, η οποία είναι απλή καθώς δεν υπάρχουν γειτνιάζοντα πρωτόνια. Η ολοκλήρωση της κορυφής αντιστοιχεί σε εννιά πρωτόνια, τρία πρωτόνια για κάθε ένα από τα τρία μεθύλια. Στα 2.58ppm αντιστοιχίζονται τα δύο πρωτόνια του μεθυλίου που συνδέεται στον άνθρακα του καρβοξυλίου του καρβοξυλικού οξέος και η κορυφή είναι τριπλή λόγω των δύο γειτνιαζόντων πρωτονίων. Ελάχιστα πιο προστατευμένα είναι τα δύο πρωτόνια του μεθυλίου δίπλα στο καρβονύλιο του λεβουλινικού οξέος και αποτυπώνονται με μία τριπλή -λόγω των δύο γειτονικών πρωτονίων- κορυφή στα 2.30ppm. Στα υψηλότερα μαγνητικά πεδία ευρίσκονται τα πιο προστατευμένα πρωτόνια του μεθυλίου του λεβουλινικού οξέος, ως μία ευρεία κορυφή στα 2.07ppm. Σε αυτό το σημείο πρέπει να τονιστεί ότι στο φάσμα δεν αποτυπώνεται πουθενά το πρωτόνιο της καρβοξυλομάδας του καρβονυλικού οξέος. Αυτή η παρατήρηση στηρίζει την υπόθεση ότι έχει γίνει πράγματι μεταφορά πρωτονίου και παραγωγή νερού, το οποίο εξατμίστηκε. Μάλιστα κατά την εξάτμιση υπό κενό το ιοντικό υγρό ζυγίζοταν κατά τακτά χρονικά διαστήματα και παρατηρήθηκε μείωση στο βάρος του όση και η θεωρητική μάζα του νερού που

είτε προϋπήρχε στα συστατικά είτε παράχθηκε κατά την ανάμιξη. Η παραγωγή του ιοντικού υγρού με αρχικό συστατικό την υδροξυχολίνη αντί της χλωριούχου χολίνης έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή νερού αντί για υδροχλώριο.

Συμπληρωματικός χαρακτηρισμός γίνεται και με το φάσμα IR του ιοντικού υγρού.



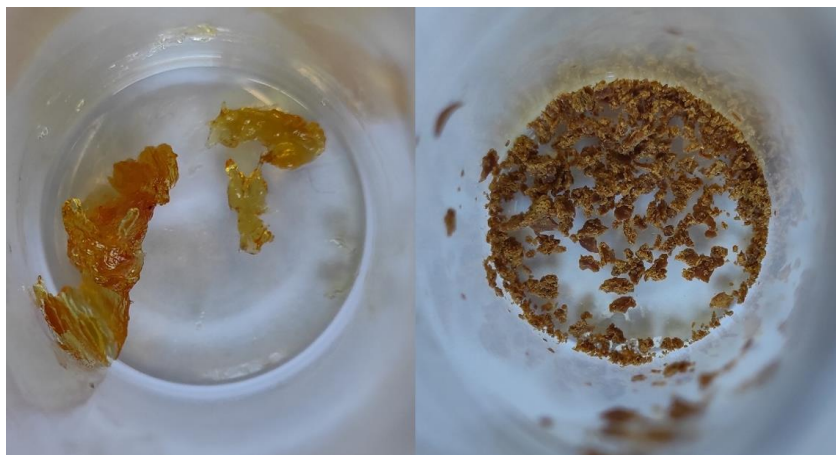
Γράφημα 2. Φάσμα IR του ιοντικού υγρού Y1.

Κατ' αρχάς, στο εύρος κυματαριθμών $3750-2700\text{cm}^{-1}$ παρατηρείται μια ιδιαίτερα ευρεία κορυφή. Η κορυφή αυτή πιθανώς αποδίδεται στο συνδυασμό των -OH δεσμών της χολίνης με το καρβοξυλικό οξύ και συνεπώς, αποτυπώνει μία αλληλεπίδραση μεταξύ των ιόντων. Η δόνηση τάσης του δεσμού C=O του κατιόντος του λεβουλινικού οξέος αντιστοιχεί στη χαρακτηριστική κορυφή στον κυματαριθμό 1714.41cm^{-1} . Ακόμα, οι κορυφές 1166.72cm^{-1} και 1087.66cm^{-1} προκύπτουν από δόνηση τάσης των δεσμών C-N και C-O της χολίνης.

3.1.1.2 Ιοντικά υγρά 2 & 3

Έγινε προσπάθεια σύνθεσης δύο ιοντικών υγρών σε γραμμομοριακή αναλογία 1:1 υδροξυχολίνης και δωδεκανοϊκού ή βανιλικού οξέος. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε αιθανόλη για να διαλυθούν τα οξέα που ήταν στερεά. Μάλιστα το βανιλικό οξύ απαιτούσε περισσότερη ποσότητα αιθανόλης για να διαλυθεί. Αυτό που παρατηρήθηκε είναι πως μετά τη σύνθεση του

μίγματος των αρχικών συστατικών, κατά την εξάτμιση του νερού και της αιθανόλης, το αρχικά ιξώδες μίγμα εξακολουθούσε να γίνεται περισσότερο ιξώδες έως ότου τελικά προέκυψε στερεό προϊόν. Στην περίπτωση της χολίνης με το δωδεκανοϊκό οξύ, προέκυψε ένα κολλώδες στερεό με κέρινη όψη. Αντίθετα, στην περίπτωση του βανιλικού οξέος το στερεό σχηματίστηκε αρκετά γρηγορότερα και ήταν πιο εύθρυπτο και είχε εμφάνιση μεγάλων κόκκων. Άρα, αυτό που μπορεί να ανακύψει είναι ότι για τις συγκεκριμένες συνθήκες και αναλογίες παρασκευής δεν προέκυψε ιοντικό υγρό θερμοκρασίας δωματίου, καθώς τα προϊόντα δεν είναι σε υγρή φάση.



Εικόνα 18. IY₂ (αριστερά) σε μορφή συμπαγούς κολλώδους στερεού και IY₃ (δεξιά) ως πιο εύθρυπτο κοκκώδες στερεό.

Υδροξυχολίνη – Δωδεκανοϊκό οξύ

CH:LevA (1:1): ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ: 4.10 (s, 2H, (CH₃)₃N⁺CH₂CH₂OH), 3.73 (t, J=6.9, 2H, (CH₃)₃N⁺CH₂CH₂OH), 3.37 (brs, 9H, (CH₃)₃N⁺CH₂CH₂OH), 2.12-2.16 (brm, 2H, CH₃(CH₂)₈CH₂CH₂COO⁻), 1.54-1.60 (brm, 2H, CH₃(CH₂)₈CH₂CH₂COO⁻), 1.26 (br, 16H, CH₃(CH₂)₈CH₂CH₂COO⁻), 0.88 (t, J=4.2, 3H, CH₃(CH₂)₈CH₂CH₂COO⁻).

Στο φάσμα ¹H NMR δεν αποτυπώνεται πουθενά το πρωτόνιο του καρβοξυλίου του δωδεκανοϊκού οξέος, αλλά ούτε και το πρωτόνιο της υδροξυλομάδας της χολίνης. Η απουσία του συγκεκριμένου πρωτονίου του οξέος αποτελεί ένδειξη ότι έχει λάβει χώρα μεταφορά πρωτονίου από το οξύ στο υδροξείδιο που είχε αρχικά η χολίνη με κατ' επέκταση παραγωγή νερού το οποίο εξατμίστηκε. Συνεπώς, έχει γίνει η μεταφορά πρωτονίου και όντως, έχει προκύψει ένα ιοντικό στερεό. Ίσως η παρουσία νερού να είναι καθοριστική για το σχηματισμό ιοντικού διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου.

Υδροξυχολίνη – Βανιλικό οξύ

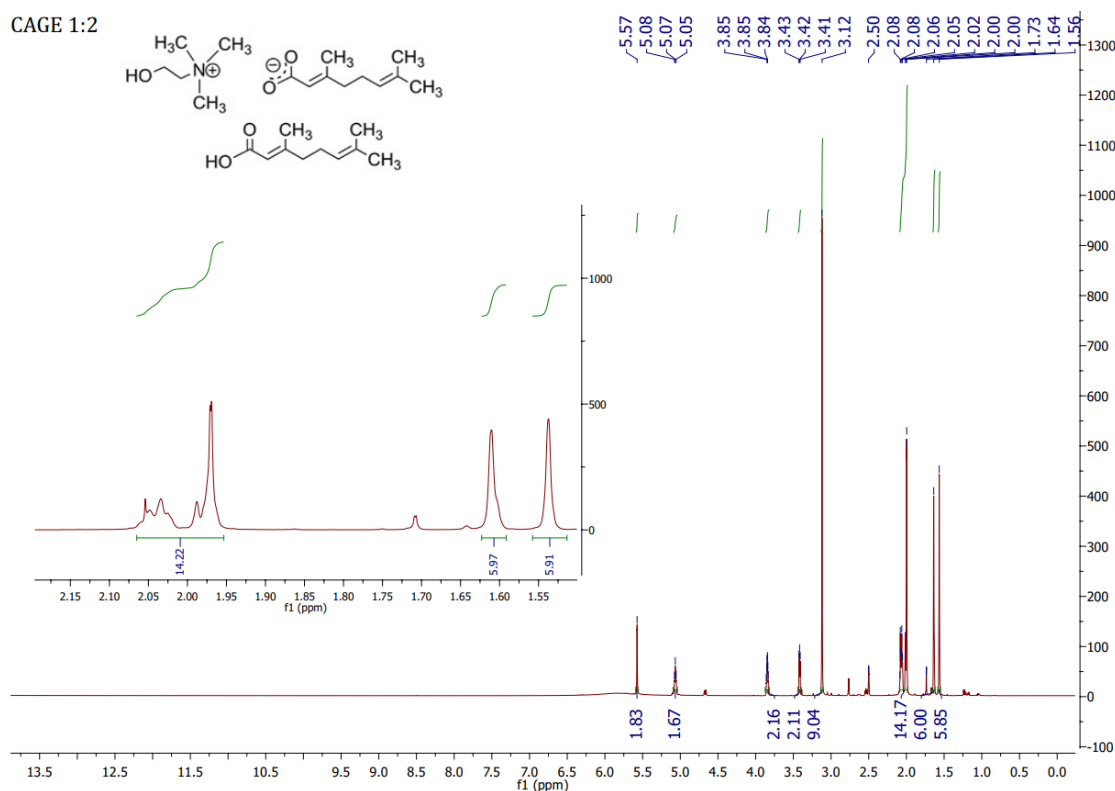
CH:VanA (1:1): ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ :7.39 (s, 1H, $\text{C}^1(\text{COOH})\text{C}^2\text{H}-\text{C}^3(\text{OCH}_3)\text{C}^4(\text{OH})\text{C}^5\text{HC}^6\text{H}$), 7.26 (d, $J=7.8$, 1H, $\text{C}^1(\text{COOH})\text{C}^2\text{HC}^3(\text{OCH}_3)\text{C}^4(\text{OH})-\text{C}^5\text{HC}^6\text{H}$). 6.64 (d, $J=7.8$, 1H, $\text{C}^1(\text{COOH})\text{C}^2\text{HC}^3(\text{OCH}_3)\text{C}^4(\text{OH})\text{C}^5\text{HC}^6\text{H}$), 3.87 (t, $J=3.6$, 2H, $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 3.71 (s, 3H, $\text{C}^1(\text{COOH})\text{C}^2\text{HC}^3(\text{OCH}_3)\text{C}^4(\text{OH})\text{C}^5\text{HC}^6\text{H}$), 3.44 (t, $J=5.1$, 2H, $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 3.13 (brs, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$).

Ούτε σε αυτό το φάσμα ^1H NMR αποτυπώνεται το πρωτόνιο του καρβοξυλίου του βανιλικού οξέος, η απουσία του οποίου αποτελεί ένδειξη ότι έχει λάβει χώρα μεταφορά πρωτονίου με κατ' επέκταση παραγωγή νερού το οποίο εξατμίστηκε. Το στερεό που έχει προκύψει αποτελείται από ιόντα αλλά δεν είναι σε υγρή κατάσταση σε θερμοκρασία δωματίου.

Τα φάσματα ^1H NMR των δύο προηγούμενων ιοντικών στερεών σε θερμοκρασία περιβάλλοντος παρουσιάζονται στο παράρτημα.

3.1.1.3 CAGE 1:2

Μετά το πέρας της παρασκευής, προκύπτει ένα ιξώδες, διαυγές, υποκίτρινο ρευστό με γραμμομοριακή αναλογία (κατιόντος χολίνης:γερανικού ανιόντος: γερανικό οξύ) να είναι (1:1:1).



Γράφημα 3. Φάσμα ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) του ιοντικού υγρού CAGE (1:2).

Η συχνότητα του οργάνου NMR για τη λήψη του φάσματος είναι 600MHz και ο διαλύτης είναι το δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-d₆) το οποίο αποτυπώνεται με χαρακτηριστική κορυφή στα 2.50ppm.

Από το φάσμα ανακύπτει: CAGE (1:2): ¹H NMR (600MHz, DMSO-d₆) δ: 5.57 (s, 2H), 5.08 (t, J=6.9, 2H), 3.83-3.86 (m, 2H), 3.42 (t, J=4.8, 2H), 3.12 (s, 9H), 2.00-2.09 (m, 14H), 1.64 (s, 6H), 1.56 (s, 6H).

Τα αποτελέσματα του φάσματος συμφωνούν με αντίστοιχες βιβλιογραφικές πηγές.^[98] Να σημειωθεί ότι τα πρωτόνια που αντιστοιχούν στο γερανικό οξύ θα εμφανίζονται διπλά, καθώς το γερανικό υπάρχει και στη μορφή ιόντος και στη μορφή οξέος. Αναλυτικότερα ξεκινώντας από τα χαμηλά μαγνητικά πεδία, η απλή κορυφή στα 5.57ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του C-2 (C-1 θεωρείται ο άνθρακας της καρβοξυλομάδας) του γερανικού οξέος ή ανιόντος, καθώς είναι το πιο αποπροστατευμένο δίπλα σε διπλό δεσμό ανθράκων και σε καρβοξυλομάδα, ενώ η κορυφή είναι απλή γιατί δεν υπάρχει κανένα γειτονικό πρωτόνιο. Στα 5.08ppm εμφανίζεται μια τριπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης J= 6.9Hz, και αφορά στο πρωτόνιο του C-6 του γερανικού, το οποίο έχει δύο γειτονικά πρωτόνια και βρίσκεται συνδεδεμένο με άνθρακα που συμμετέχει σε διπλό δεσμό και κατά συνέπεια, είναι το δεύτερο κατά σειρά πιο αποπροστατευμένο. Κατά την ολοκλήρωση προκύπτουν δύο τέτοια πρωτόνια: ένα για το γερανικό ανιόν και ένα για το γερανικό οξύ.

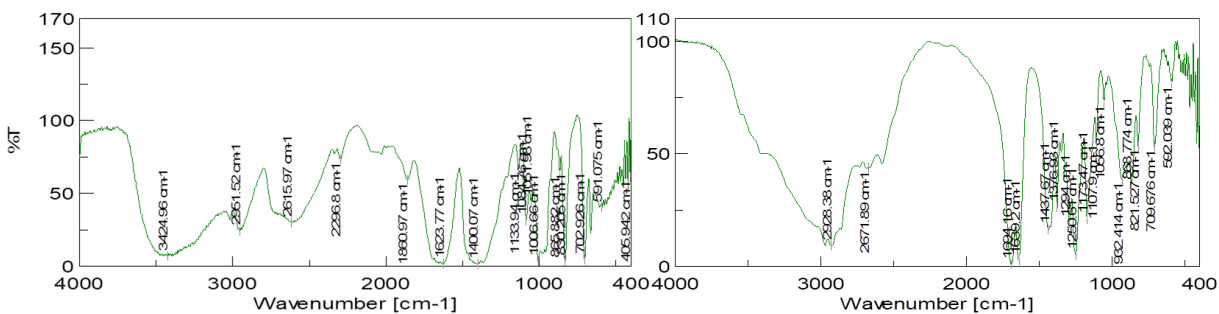
Στη συνέχεια, τα δύο πρωτόνια του, συνδεδεμένου με το υδροξύλιο, άνθρακα της χολίνης έχουν τρία γειτονικά πρωτόνια και γι' αυτό, αποτυπώνονται ως μία πολλαπλή κορυφή στα 3.86ppm. Τα δύο πρωτόνια του, συνδεδεμένου με το άζωτο, άνθρακα της χολίνης έχουν δύο γειτονικά πρωτόνια και έτσι, εμφανίζουν τριπλή κορυφή στα 3.42ppm με σταθερά σύζευξης J=4.8Hz. Τα υπόλοιπα εννιά πρωτόνια των τριών μεθυλίων της χολίνης δεν γειτνιάζουν με άλλα πρωτόνια και αποτυπώνονται με μία απλή κορυφή εννιά πρωτονίων στα 3.12ppm.

Έπειτα, στα 2.00-2.09ppm υπάρχει μία εκτεταμένη πολλαπλή κορυφή που αντιστοιχεί σε δεκατέσσερα πρωτόνια. Αυτά τα πρωτόνια είναι τα τρία πρωτόνια του μεθυλίου που συνδέεται στον C-3 της κύριας αλυσίδας του γερανικού οξέος και ιόντος, τα δύο πρωτόνια του C-4 και τα υπόλοιπα δύο του C-5 του γερανικού οξέος και ιόντος. Επειδή τα πρωτόνια αυτά υπάρχουν και στο γερανικό οξύ και στο γερανικό ανιόν, συνολικά προκύπτουν δεκατέσσερα πρωτόνια ($2 \cdot (2_{C4} + 2_{C5} + 3_{\text{μεθυλίου}}) = 14$). Αρχικά, αναμένεται πως τα πρωτόνια του μεθυλίου να είναι ελάχιστα πιο αποπροστατευμένα από τα υπόλοιπα, καθώς βρίσκεται κοντύτερα στην καρβοξυλομάδα. Όμως, αυτό δε φαίνεται να συμβαίνει. Με προσεκτικότερη ανάλυση του φάσματος είναι δυνατόν να παρατηρηθεί ότι η κορυφή στα 2.00ppm πιθανότατα αντιστοιχεί στα πρωτόνια του μεθυλίου, ενώ οι πολλαπλές κορυφές κοντά στα 2.08ppm αντιστοιχούν στα πρωτόνια των C-4 και C-5. Αυτή η σειρά αποτίμησης από το φάσμα NMR συμβαδίζει με τη βιβλιογραφία^{[95] [98] [99]} και με το φάσμα ¹H NMR για το γερανικό οξύ. Στα υψηλότερα μαγνητικά πεδία εμφανίζονται δύο απλές κορυφές, η μία στα 1.64ppm και η άλλη στα 1.56ppm. Η πρώτη αφορά στα τρία πρωτόνια του μεθυλίου που συνδέεται με στον

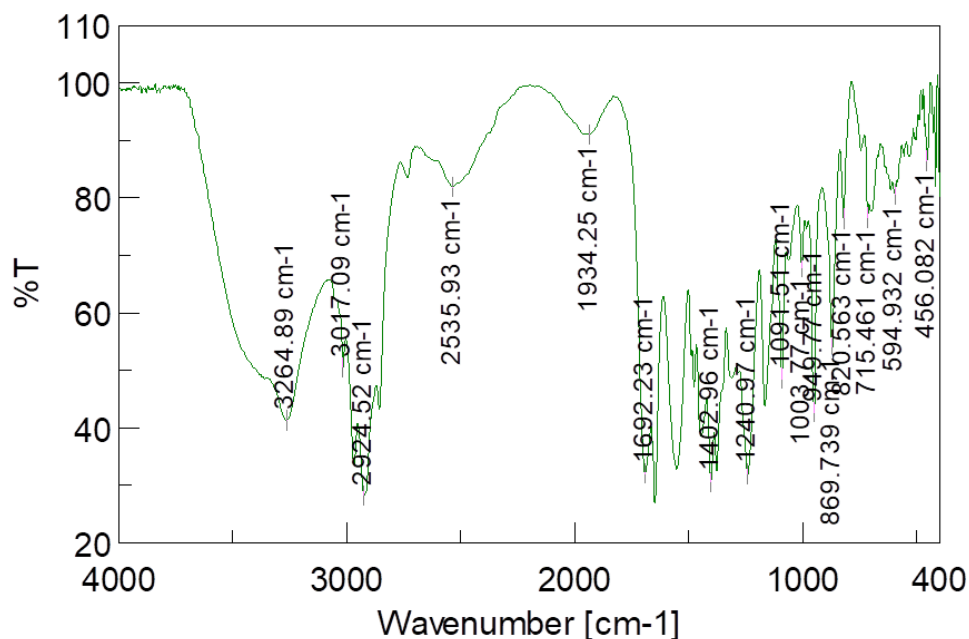
C-7 της κύριας αλυσίδας και η δεύτερη στα τρία πρωτόνια του C-8 (του πιο απομακρυσμένου άνθρακα από την καρβοξυλομάδα). Τα πρωτόνια αυτά δεν γειτνιάζουν με άλλα και γι' αυτό οι κορυφές είναι απλές. Επίσης, κατά την ολοκλήρωση προκύπτουν δώδεκα πρωτόνια, καθώς έχει προστεθεί διπλάσια αναλογία γερανικού οξέος ($2 \cdot (3+3)=12$). Τέλος, αυτά τα πρωτόνια είναι τα πιο απομακρυσμένα από της καρβοξυλομάδα και συνεπώς, εμφανίζονται όλα μαζί σε υψηλά μαγνητικά πεδία ως τα πιο προστατευμένα. Πάντως να τονιστεί ότι στο φάσμα δεν αποτυπώνεται το πρωτόνιο του γερανικού οξέος που βρίσκεται σε περίσσεια. Παρακάτω δίνεται αναλυτικότερη αποτίμηση του φάσματος.

CAGE (1:2): $^1\text{H NMR}$ (600MHz, DMSO- d_6) δ : 5.57 (s, 2H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)\text{CHCOOH}$), 5.08 (t, $J=6.9$, 2H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)\text{CHCOOH}$), 3.83-3.86 (m, 2H, $\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 3.42 (t, $J=4.8$, 2H, $\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 3.12 (s, 9H, $\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 2.08 (m, 8H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)\text{-CHCOOH}$), 2.00 (m, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)\text{CHCOOH}$), 1.64 (s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)\text{CHCOOH}$), 1.56 (s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)\text{-CHCOOH}$).

Ο χαρακτηρισμός μέσω FT-IR του CAGE 1:2 δρα συμπληρωματικά στο φάσμα NMR. Μάλιστα παρουσιάζει και δυσκολία στην ερμηνεία διάφορων κορυφών, καθώς υπάρχουν διάφορες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αρχικών ενώσεων.



Γράφημα 4. Φάσμα FTIR (αριστερά) για τη χολίνη (Choline Bicarbonate) και (δεξιά) για το γερανικό οξύ.



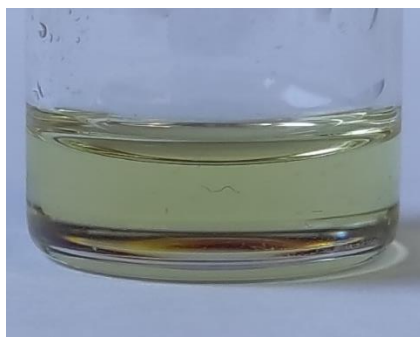
Γράφημα 5. Φάσμα IR για το CAGE (1:2).

Στο IR φάσμα αποτυπώνεται μία ευρεία κορυφή στα 3264cm^{-1} , η οποία αποδίδεται σε δόνηση τάσης του συνδυασμού του δεσμού -OH της χολίνης και του γερανικού οξέος, όπως αυτό είναι παρόν στην αναλογία 1:2. Φαίνεται σαφώς η διαφορά από το φάσμα της χολίνης, καθώς το εύρος της κορυφής στα 3424.96cm^{-1} έχει μειωθεί αισθητά, η κορυφή έχει μετατοπιστεί σε χαμηλότερους κυματαριθμούς και η έντασή της είναι συγκριτικά μικρότερη από την ένταση της κορυφής δόνησης του υδροξυλίου της χολίνης. Αυτό υποδεικνύει πως ενώ αρχικά δεν αναμένεται να υπάρχει ξεκάθαρη κορυφή σε εκείνο το εύρος γιατί το υδρογόνο του υδροξυλίου της χολίνης έχει απομακρυνθεί μετά την παραγωγή νερού κατά την αντίδραση, πιθανώς το οξυγόνο αλληλεπιδρά με το γερανικό οξύ και τοιουτοτρόπως προκύπτει η κορυφή. Τόσο η μετατόπιση της κορυφής όσο και η μείωση του εύρους της είναι ενδεικτικό της αλληλεπίδρασης.

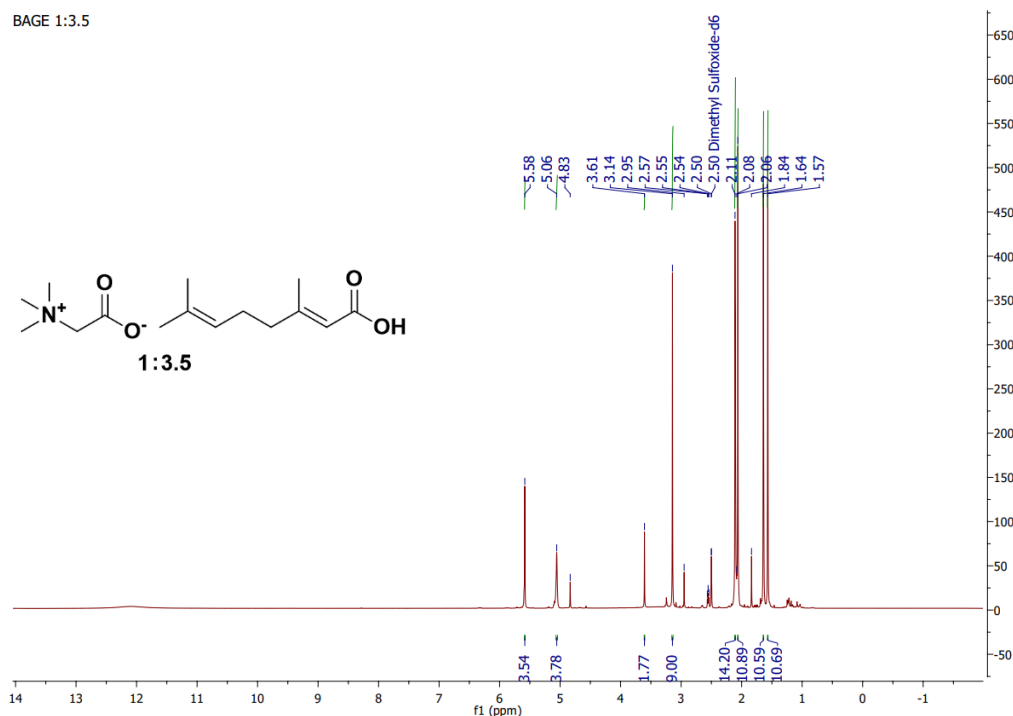
Στο εύρος $3000\text{-}2750\text{cm}^{-1}$ εμφανίζεται κορυφή στα 2924.52cm^{-1} , η οποία αντιστοιχεί σε δόνηση τάσης του δεσμού του υδροξυλίου του γερανικού οξέος. Οι δονήσεις τάσης του καρβονυλίου του οξέος και του ανιόντος του είναι υπεύθυνες για την κορυφή στον κυματαριθμό 1692.23cm^{-1} . Μπορεί να παρατηρηθεί ότι το υδροξύλιο και το καρβονύλιο του οξέος εμφανίζουν ίδιο ποσοστό διαπερατότητας, καθώς ανήκουν και τα δύο στο γερανικό οξύ, άρα, υπάρχουν σε αντίστοιχες αναλογίες. Η κορυφή στα 1402.96cm^{-1} ενδεχομένως οφείλεται σε κάμψη των δεσμών υδροξυλίου του οξέος. Ίσως η κορυφή στα 2535.93cm^{-1} να αφορά και σε ίχνη διαλυμένου διοξειδίου του άνθρακα που δεν απομακρύνθηκε από στο δείγμα.

3.1.1.4 BAGE 1:3.5

Το BAGE (Betaine And Geranic Acid) παρασκευάστηκε από βεταΐνη και γερανικό οξύ σε γραμμομοριακή αναλογία 1 προς 3.5. Αυτό που προκύπτει είναι ένα ιξώδες υποκίτρινο υγρό σε θερμοκρασία δωματίου. Η αναλογία αυτή προέκυψε ύστερα από πειραματική μελέτη άλλων αναλογιών. Σε χαμηλότερη αναλογία γερανικού οξέος και μετά το πέρας της ανάδευσης και κατά την αποθήκευσή του, το προκύπτουν ρευστό δε διατηρούσε τη διαύγειά του.

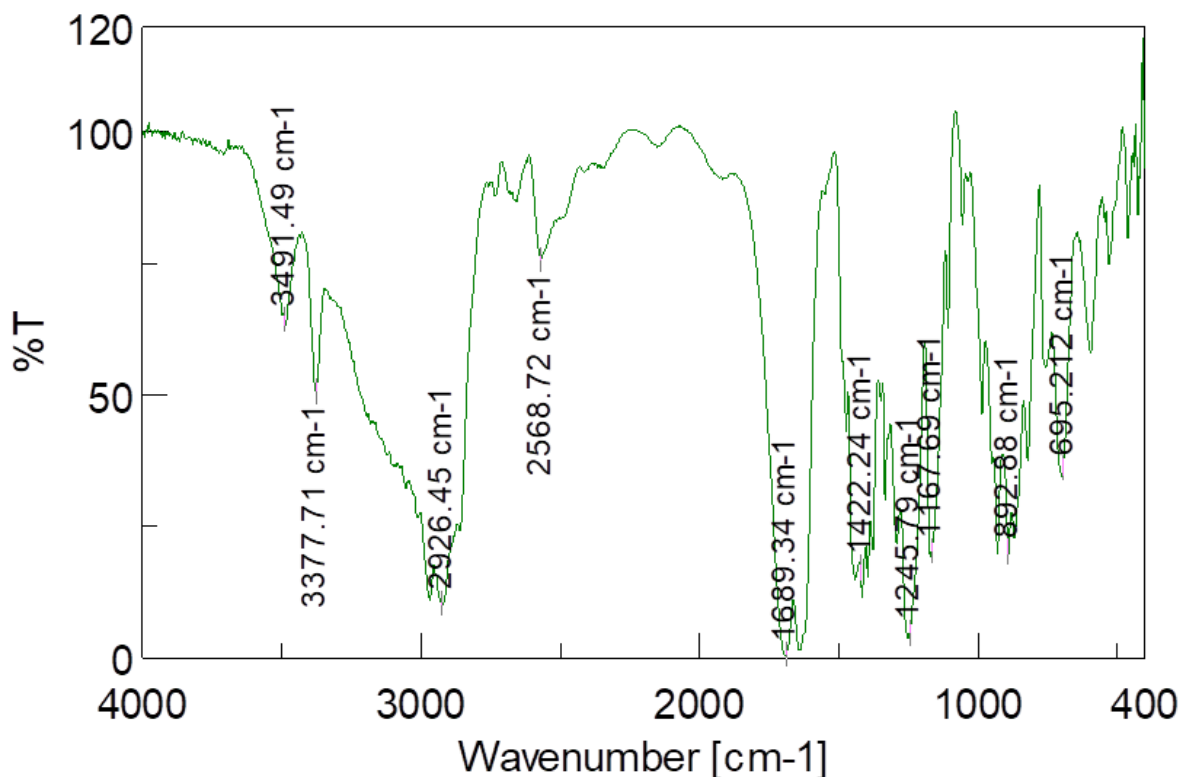


Εικόνα 19. Υποκίτρινο διαυγές BAGE 1:3.5.

Γράφημα 6. Φάσμα ^1H NMR (600MHz, DMSO-d_6) του BAGE (1:3.5).

Η συχνότητα του οργάνου NMR για τη λήψη του φάσματος είναι 600MHz και ο διαλύτης είναι το δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-d_6) το οποίο αποτυπώνεται με χαρακτηριστική κορυφή στα 2.50ppm.

Από το φάσμα ανακύπτει: BAGE (1:3.5): $^1\text{H NMR}$ (600MHz, DMSO- d_6) δ : 5.57 (s, 3.5H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}_2\text{H}$), 5.08 (brs, 3.5H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}_2\text{H}$), 3.58 (s, 2H, $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$), 3.12 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$), 2.08 (brs, 14H ((2+2)*3.5), $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}_2\text{H}$), 2.03 (brs, 10.5H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}_2\text{H}$), 1.61 (brs, 10.5H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}_2\text{H}$), 1.56 (s, 10.5H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}_2\text{H}$).



Γράφημα 7. Φάσμα IR για το BAGE (1:3.5).

Η κορυφή στα 2926.45cm^{-1} εμφανίζεται και εδώ, όπως στα CAGE (1:1) και (1:2), και αφορά σε δόνηση τάσης του υδροξυλίου του γερανικού οξέος. Η κορυφή στα 3491.49cm^{-1} αποδίδεται σε δόνηση τάσης του οξυγόνου του υδροξυλίου της βεταΐνης που μάλλον αλληλεπιδρά με το υδρογόνο του γερανικού οξέος. Τέλος, η δόνηση τάσης του των δεσμών $\text{C}=\text{O}$ της καρβοξυλομάδας του γερανικού οξέος και της βεταΐνης αποτυπώνονται με κορυφή στο εύρος κυματαριθμών $1720\text{-}1630\text{cm}^{-1}$.

Τα φάσματα των υπόλοιπων διαλυτών δίνονται στο Παράρτημα Ι.

3.2 Χαρακτηρισμός εκχυλισμάτων

Μολονότι όλες οι εκχυλίσεις πραγματοποιούνται σε probe υπερήχων και με τη χρήση αιθανόλης, νερού και βαθέως ευτηκτικών διαλυτών, μπορούν να χωριστούν σε δύο μέρη. Στο πρώτο μέρος, τελείται εκχύλιση με μοναδικό διαλύτη το Bet:LA με ή χωρίς προσθήκη νερού και η πρώτη ύλη ποικίλει από φυσικά ξηραμένο φρέσκο τζίντζερ, φυσικά ξηραμένο φρέσκο τζίντζερ κόκκου 212nm και ξηρού θερμικά επεξεργασμένου εμπορικού τζίντζερ σε μορφή σκόνης. Σε αυτό το μέρος, μελετάται η επιρροή της αραίωσης του NaDES με νερό και της πρώτης ύλης στα χαρακτηριστικά του εκχυλίσματος. Στο δεύτερο μέρος των εκχυλίσεων, πραγματοποιείται εκχύλιση μόνο του ξηρού τζίντζερ με διάφορους φυσικούς βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες, ώστε να ευρεθεί ο καταλληλότερος. Ενώ στο πρώτο μέρος των εκχυλίσεων χρησιμοποιείται διαφορετική πρώτη ύλη, στο δεύτερο εκχυλίζεται η ίδια πρώτη ύλη στις ίδιες ακριβώς συνθήκες, ώστε τα μετρούμενα αποτελέσματα να οφείλονται στη διαφοροποίηση του διαλύτη και όχι σε διαφοροποίηση της πρώτης ύλης.

Σε όλα τα εκχυλίσματα ευρίσκεται και αξιολογείται η αντιοξειδωτική τους ικανότητα μέσω του δείκτη IC₅₀ και προσδιορίζεται το φαινολικό φορτίο (Total Phenolic Content, TPC) που περιέχουν. Ο τρόπος υπολογισμού αυτών των ιδιοτήτων αναπτύσσεται αναλυτικά στο Πειραματικό Μέρος.

3.2.1 Αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων

Το τζίντζερ είναι ένα βότανο που περιέχει πληθώρα πολύτιμων αντιοξειδωτικών ενώσεων που έχουν την ικανότητα να σαρώνουν τις ελεύθερες ρίζες και να τις αδρανοποιούν. Έτσι, μέσω της εκχύλισής του επιτυγχάνεται απομόνωση των ενώσεων αυτών στο χρησιμοποιούμενο διαλύτη. Όταν τα εκχυλίσματα βρεθούν στο ίδιο περιβάλλον με τη ρίζα DPPH, τότε οι ενώσεις που έχουν απομονωθεί αρχίζουν να απελευθερώνονται και να αλληλεπιδρούν με τη ρίζα DPPH. Η αλληλεπίδραση οδηγεί σε αλλαγή χρώματος και μέσω της διαδικασίας αυτής, η οποία περιγράφεται στο Πειραματικό Μέρος, είναι ικανός ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων.

Για κάθε εκχύλιση που παραλαμβάνεται από το probe υπερήχων σχεδιάζεται το γράφημα της επί τοις εκατό αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης εκχυλίσματος για τους χρόνους επώασης των δειγμάτων. Μετά από κατάλληλες δοκιμές έχει επιβεβαιωθεί ότι η καταλληλότερη γραμμή τάσης (υψηλότερο R²) είναι ευθεία γραμμή. Οπότε σε κάθε διάγραμμα θεωρείται ότι η συσχέτιση της αναστολής της ρίζας DPPH και της συγκέντρωσης του δείγματος σε εκχύλιση είναι γραμμική και γι' αυτό επιλέγεται ως γραμμή τάσης μία ευθεία. Το ποσοστό αναστολής της ρίζας για κάθε δείγμα υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\%Inhibition = \frac{A_{blank} - A_{sample}}{A_{blank}} * 100$$

Όπου A_{blank} και A_{sample} η απορρόφηση των τυφλών διαλυμάτων και των δειγμάτων με εκχύλισμα αντίστοιχα. Έτσι, υπολογίζεται η αναστολή της ρίζας και δημιουργούνται τα απαραίτητα γραφήματα συναρτήσεως της συγκέντρωσης που παρουσιάζονται στο Παράρτημα II. Η τιμή του IC_{50} υπολογίζεται από τον τύπο:

$$IC_{50} = \frac{50 - b}{a}$$

Όπου a η κλίση και b η αποτέμνουσα της ευθείας του γραφήματος.

Από τα γραφήματα φαίνεται ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του διαλύματος σε εκχύλισμα τόσο αυξάνεται και το ποσοστό αναστολής της ρίζας DPPH. Αυτό είναι απόλυτα λογικό, καθώς αύξηση της συγκέντρωσης εκχυλισμάτων συνεπάγεται και αύξηση της ποσότητας των εκχυλισμένων ενώσεων του τζίντζερ που σαρώνουν και ανάγουν μεγαλύτερο αριθμό ριζών DPPH. Το εκχύλισμα μπορεί να προσομοιαστεί με μία αποθήκη αντιοξειδωτικών ουσιών, η οποία παρουσία ελεύθερων ριζών επιτρέπει στις αποθηκευμένες ουσίες να ανάγουν τις ρίζες. Όσο πιο γεμάτη είναι η αποθήκη τόσο περισσότερες ρίζες θα ανάγει.

Α' Μέρος

Στο πρώτο μέρος γίνεται εκχύλιση διαφορετικής πρώτης ύλης όσον αφορά στην πρότερη επεξεργασία της και το εκχυλιστικό μέσο (Bet:LA:W) χρησιμοποιείται με διαφορετική περιεκτικότητα σε νερό. Ο υπολογισμός της αναστολής της ρίζας DPPH έγινε στα 38 και 58 λεπτά αντίστοιχα για κάθε δείγμα.

Πίνακας 20. Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης και IC_{50} για τα εκχυλίσματα των διαφορετικών μορφών τζίντζερ.

Κωδικός εκχυλίσματος	Χρόνος επώασης (min)	IC_{50} ($\mu L_{εκχ}/mL_{\delta/τος}$)	IC_{50} ($mg_{εκχ}/mL_{\delta/τος}$)
GT ₁	38	13.73	16.68
	58	11.87	14.43
GT ₂	38	22.11	26.20
	58	19.27	22.83
GT ₃	38	29.04	35.28
	58	24.57	29.85
GT ₄	38	18.23	23.88
	58	15.73	20.60

Υπενθυμίζεται ότι στα εκχυλίσματα του α' μέρους η αναλογία βάρους διαλύτη προς πρώτη ύλη είναι σταθερή και ίση με 15:1. Στο εκχύλισμα GT₁ πρώτη ύλη είναι το ξηρό εμπορικό, στα GT₂-GT₃ το φρέσκο με φυσική ξήρανση το φρέσκο με φυσική ξήρανση και στο GT₄ το φρέσκο με κοκκομετρία 212nm. Στα GT₃-GT₄ ο διαλύτης ήταν ο Bet:LA:W (1:2:2.5) και στα GT₁-GT₂ ο Bet:LA:W (1:2:2.5) και προσθήκη επιπλέον 20% κατά βάρος νερού. Επίσης έχει μετρηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα του Bet:LA:W (1:2:2.5) και ευρέθηκε πως συνεισφέρει αμελητέα στην αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

Από τα αποτελέσματα αποφαίνεται ότι τη βέλτιστη αντιοξειδωτική δράση την έχει το εκχύλισμα (GT₁) με το ξηρό εμπορικό τζίντζερ και διαλύτη που έχει αραιωθεί με επιπρόσθετο νερό. Αυτό είναι απόλυτα λογικό, καθώς το συγκεκριμένο είδος τζίντζερ έχει το χαμηλότερο ποσοστό υγρασίας σε σχέση υπόλοιπα είδη και συνεπώς, η ίδια μάζα πρώτης ύλης περιέχει περισσότερη ποσότητα «πραγματικού» τζίντζερ. Δηλαδή όλα τα εκχυλίσματα προέρχονται από ίδια μάζα πρώτης ύλης (200mg), αλλά όταν η πρώτη ύλη περιέχει υγρασία τότε η πραγματική μάζα τζίντζερ που εκχυλίζεται είναι μικρότερη από τη ζυγιζόμενη. Επίσης, το ξηρό εμπορικό τζίντζερ έχει χαμηλότερη κοκκομετρία σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη, με αποτέλεσμα ο διαλύτης να έρχεται πιο γρήγορα και εύκολα σε επαφή με την πρώτη ύλη, η διάχυσή του εντός της πρώτης ύλης να επιτυγχάνεται αποτελεσματικότερα και άρα, η διάλυση των πολύτιμων ενώσεων-στόχων να είναι βελτιωμένη. Η αποδοτικότερη εκχύλιση των ενώσεων του τζίντζερ έχει αντίκτυπο και στην αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος, αφού περισσότερες εκχυλισμένες αντιοξειδωτικές ενώσεις ενισχύουν την αντιοξειδωτική δράση.

Επόμενη υψηλότερη δράση εμφανίζει το εκχύλισμα (GT₄), ενώ τη χαμηλότερη διαθέτει το εκχύλισμα GT₃. Τα GT₃-GT₄ εκχυλίσματα προκύπτουν από διαλύτη με την ίδια περιεκτικότητα σε νερό και η μόνη διαφορά τους είναι ότι ως πρώτη ύλη το πρώτο έχει το φρέσκο τζίντζερ με μεγάλα κομμάτια και το δεύτερο έχει το φρέσκο τζίντζερ με χαμηλότερη κοκκομετρία. Το συμπέρασμα που ανακύπτει είναι ότι όσο μικρότερο μέγεθος κόκκων έχει η πρώτη ύλη τόσο βελτιώνεται η απόδοση της εκχύλισης και συνάμα η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος. Αυτό συμβαίνει γιατί μικρότερο μέγεθος κόκκων επιτρέπει την καλύτερη επαφή διαλύτη και πρώτης ύλης και η διάχυση του διαλύτη εντός της εκχυλιζόμενης μάζας να γίνεται γρηγορότερα. Έτσι, ο διαλύτης μεταφέρεται γρηγορότερα εντός της μάζας της πρώτης ύλης, διαλύει τις ενώσεις που περιέχονται εκεί και στη συνέχεια, η μεταφέρεται εξωτερικά της πρώτης ύλης ως εκχύλισμα πλούσιο σε αντιοξειδωτικές ενώσεις. Δηλαδή σε μικρότερο μέγεθος κόκκων τα φαινόμενα μεταφοράς μάζας επιτυγχάνονται γρηγορότερα με αποτέλεσμα το εκχύλισμα να έχει απομονώσει περισσότερα αντιοξειδωτικά και να εμφανίζει καλύτερη αντιοξειδωτική δράση.

Τα εκχυλίσματα GT₂-GT₃ έχουν ίδια πρώτη ύλη, αλλά το εκχύλισμα GT₂ περιέχει διαλύτη με 20% κατά βάρος επιπρόσθετο νερό. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα αποφαίνεται ότι όταν ο φυσικός βαθέως ευτηκτικός διαλύτης αραιώνεται με νερό, το εκχύλισμα έχει βελτιωμένη αντιοξειδωτική δράση. Μολονότι κάποιος θα μπορούσε να ισχυριστεί ότι η αραιώση του

διαλύτη με νερό μειώνει την εκχυλιστική ικανότητα, αφού ο NADES καλύτερος διαλύτης βιοδραστικών ενώσεων, αυτό δεν ισχύει σύμφωνα με τα αποτελέσματα. Αυτό συμβαίνει κατά πάσα πιθανότητα, γιατί η προσθήκη νερού στον NADES μειώνει το ιξώδες του και επομένως, η διάχυση και τα υπόλοιπα φαινόμενα μεταφοράς που λαμβάνουν χώρα συμβαίνουν πιο γρήγορα.

Τελικά, συνάγεται το συμπέρασμα ότι το είδος και η μορφή της πρώτης ύλης και του διαλύτη επηρεάζουν σημαντικά την εκχύλιση και την αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Λιγότερο περιεχόμενο σε υγρασία και μικρότερο μέγεθος κόκκων πρώτης ύλης και ενδεχόμενη προσθήκη μικρής ποσότητας νερού για μείωση του ιξώδους βελτιώνουν την εκχύλιση του τζίντζερ.

Β' Μέρος

Στο δεύτερο μέρος πραγματοποιούνται εκχυλίσεις της ίδιας πρώτης ύλης (ξηρό εμπορικό τζίντζερ) με διαφορετικούς βαθμούς ευτηκτικούς διαλύτες, αιθανόλη και νερό. Η αναλογία διαλύτη προς την πρώτη ύλη ισούται με $25g_{NADES}/g_{ginger}$. Οι NADESs που χρησιμοποιούνται είναι οι εξής: Bet:LA:W (1:2:2.5), Bet:Gly (1:3), Glu:LA:W (1:5:6.2). χρησιμοποιούνται είτε αυτούσιοι είτε με επιπλέον προσθήκη νερού.

Αρχικά, μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση των NADESs που χρησιμοποιούνται και βρέθηκε πως είτε δε συνεισφέρουν είτε συνεισφέρουν αμελητέα στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων. Συνεπώς, η όποια δράση εμφανίζουν τα εκχυλίσματα οφείλεται στις ενώσεις που έχουν απομονώσει από το τζίντζερ.

Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε για χρόνο επώασης 15 έως 120 λεπτά ανά 15 λεπτά. Στον πίνακα 21 δίνονται οι τιμές IC_{50} για επιλεγμένους χρόνους επώασης.

Πίνακας 21. Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης και IC_{50} για τα εκχυλίσματα του ξηρού τζίντζερ για τη μισή, μία και μιάμιση ώρα επώασης των δειγμάτων.

Κωδικός εκχυλίσματος	Χρόνος επώασης (min)	IC_{50} ($\mu L_{εκχ}/mL_{\delta/τος}$)	IC_{50} ($mg_{εκχ}/mL_{\delta/τος}$)
E/Bet: LA: W	30	26.96	33.96
	60	21.50	27.08
	120	14.41	18.16
E/Glu: LA: W (1: 6: 6. 2)	30	30.30	39.46
	60	23.83	31.04
	120	17.03	21.06
E/Bet: Gly	30	29.20	35.70

	60	24.24	29.63
	120	17.92	21.91
<i>E/Bet: Gly: W(1: 3: 1)</i>	30	25.92	30.19
	60	23.52	27.40
	120	19.07	22.21
<i>E/Bet: Gly: W (1: 3: 3. 33)</i>	30	42.62	44.75
	60	32.73	34.36
	120	23.05	24.20
<i>E/EtOH: H₂O</i>	30	32.01	26.41
	60	24.46	20.18
	120	17.92	14.78
<i>E/H₂O</i>	30	49.95	51.86
	60	46.48	48.29
	120	43.38	45.55
<i>E/EtOH</i>	30	72.28	54.39
	60	45.31	34.10
	120	29.01	21.83

Σύμφωνα με τα άνωθεν ευρήματα, το εκχύλισμα με την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση έχει το E/EtOH:H₂O. Ανάμεσα στους NADESS που χρησιμοποιούνται αποφαίνεται ότι το εκχύλισμα με διαλύτη το Bet:LA:W επιτυγχάνει καλύτερη αντιοξειδωτική δράση στις δύο ώρες επώασης, δηλαδή χαμηλότερη τιμή IC₅₀.

Σύγκριση NADESS

Φαίνεται πως ο καλύτερος φυσικός βαθέως ευτηκτικός διαλύτης για την εκχύλιση του τζίντζερ στις μελετούμενες συνθήκες είναι ο Bet:LA:W, έπεται ο Glu:LA:W και ύστερα, με μικρή διαφορά είναι ο Bet:Gly.

Οι διαλύτες Bet:LA:W, Glu:LA:W και Bet:Gly:W (1:3:3.33) περιέχουν το ίδιο περίπου κατά βάρος ποσοστό νερού και συνεπώς, μπορεί να αξιολογηθούν στην ίδια βάση. Πιο αντιοξειδωτικό εκχύλισμα παράγει ο Bet:LA:W. Παρόλα αυτά παρατηρείται ότι γενικά τα εκχυλίσματα με NADESS έχουν καλή αντιοξειδωτική δράση και σχετικά παραπλήσιες τιμές IC₅₀.

Σύγκριση περιεκτικότητας Bet:Gly σε νερό.

Από το Bet:Gly έχουν παρασκευαστεί οι διαλύτες Bet:Gly:W (1:3:1) και Bet:Gly:W (1:3:3.33) με αύξουσα περιεκτικότητα σε νερό. Από τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής δράσης, φαίνεται ότι όταν αυξάνεται το υδατικό περιεχόμενο του διαλύτη σε νερό, αυξάνεται και η

τιμή IC₅₀ του αντίστοιχου εκχυλίσματος. Ενδεχομένως, αν και το νερό μειώνει το ιξώδες του διαλύτη, σε αυτές τις συνθήκες, όπου η εκχύλιση διαρκεί περισσότερο χρονικό διάστημα, η εκχυλιστική ικανότητα συνολικά του διαλύτη μειώνεται ελαφρώς καθώς το νερό δεν είναι τόσο καλό διαλύτης (όσο ο NADES) των επιθυμητών ενώσεων του τζίντζερ. Βέβαια, η ελάττωση στην αντιοξειδωτική δράση δεν είναι έντονη και τα εκχυλίσματα E/Bet:Gly:W (1:3:1) και E/Bet:Gly:W (1:3:3.33) εξακολουθούν να έχουν χαμηλή τιμή IC₅₀.

Σύγκριση αιθανόλης και νερού

Αποφαινεται ότι η αιθανόλη είναι καλό εκχυλιστικό μέσο των αντιοξειδωτικών ενώσεων του τζίντζερ και το εκχύλισμα E/EtOH διαθέτει χαμηλή τιμή IC₅₀ ανάλογη των εκχυλισμάτων με NADESs ως διαλύτες. Αντίθετα, το εκχύλισμα E/H₂O δεν έχει τόσο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση συγκρινόμενο με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα, κάτι που δηλώνει πως το νερό δεν εκχυλίζει αποδοτικά τις αντιοξειδωτικές ενώσεις. Αυτό είναι ένα αναμενόμενο εύρημα, καθώς το τζίντζερ περιέχει πληθώρα άπολων ενώσεων, τις οποίες το νερό αδυνατεί να απομονώσει από την πρώτη ύλη. Αυτό που κάνει ιδιαίτερη εντύπωση είναι πως ο συνδυασμός αιθανόλης νερού σε αναλογία 70-30% κατ' όγκο, παράγει ένα εκχύλισμα καλύτερο από τα εκχυλίσματα της καθαρής αιθανόλης και νερού. Αυτό μπορεί να προκύπτει από το γεγονός ότι το υδατικό μέρος εκχυλίζει τις πολικές ενώσεις και η αιθανόλη μπορεί να εκχυλίσει ενώσεις μη πολικές που το νερό αδυνατεί. Έτσι, η συνέργεια της αιθανόλης και του νερού δημιουργεί το εκχύλισμα E/EtOH-H₂O με την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση.

Σύγκριση εκχυλισμάτων με διαλύτη NADESs και αιθανόλη-νερό.

Παρατηρείται ότι για τα 30 λεπτά επώασης το εκχύλισμα E/EtOH-H₂O δίνει αρκετά χαμηλή τιμή IC₅₀, ενώ τα εκχυλίσματα με διαλύτη NADES εμφανίζουν μια πιο σταδιακή μείωση. Αυτό μπορεί να συμβαίνει ενδεχομένως επειδή οι NADESs λειτουργούν ως αποθηκευτικό μέσο των ενώσεων που εκχύλισαν και απαιτείται χρόνος μέχρι την απελευθέρωσή τους κατά την επώαση ή επειδή η αιθανόλη εκχυλίζει πιο μικρά μόρια που δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες ταχύτερα. Οποσδήποτε ο αριθμός πειραμάτων δεν είναι ικανός για την εξαγωγή κάποιου πρόχειρου συμπεράσματος και θα πρέπει να αναλυθεί περαιτέρω.

Γενικότερες παρατηρήσεις

Σύμφωνα με τη σχετική βιβλιογραφία^[108], η δομή και η ποιότητα των ενώσεων που έχουν εκχυλιστεί επηρεάζει την αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος. Αν και οι φαινόλες έχουν μία σταθερή κοινή δομή, στο μόριό τους υπάρχουν διαφορετικών ειδών υποκαταστάτες, η φύση και η θέση των οποίων επηρεάζουν την αντιοξειδωτική τους δράση. Επιπλέον, οι διαφορετικές ενώσεις του εκχυλίσματος μπορεί να λειτουργούν συνεργιστικά ή ανταγωνιστικά μεταξύ τους ως προς την αντιοξειδωτική δράση. Σε αυτό μπορεί να οφείλεται και η διαφοροποίηση στην αντιοξειδωτική συμπεριφορά των εκχυλισμάτων διαλυτών και εκχυλισμάτων των ίδιων διαλυτών αραιωμένων με νερό. Σε κάθε περίπτωση, παρατηρείται ότι με τη

διέλευση μεγαλύτερου χρονικού διαστήματος επώασης απαιτείται μικρότερη ποσότητα εκχυλίσματος για την αναστολή του 50% της αρχικής ποσότητας των ριζών DPPH. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στη σταδιακή απελευθέρωση των αντιοξειδωτικών ενώσεων είτε στο γεγονός ότι τα μεγάλα πολυφαινολικά μόρια δύνανται να απαιτούν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για να δεσμεύσουν τις ελεύθερες ρίζες.

Το αρκετά υψηλό ιξώδες των φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών και κατά συνέπεια, των αντίστοιχων εκχυλισμάτων τους μπορεί να επιφέρει σωρεία σφαλμάτων κατά την παρασκευή των δειγμάτων προς επώαση. Γι' αυτό, πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή για να μην υπάρχουν απώλειες εκχυλίσματος κατά την παρασκευή. Για να αντιμετωπιστούν πιθανά σφάλματα, κάθε φορά με τη μέτρηση του απαιτούμενου όγκου εκχυλίσματος ακολουθεί και ζύγισή του και οι μετρήσεις επαναλαμβάνονται εις τριπλούν για επίτευξη επαναληψιμότητας.

Τέλος, από τα άνωθι εκχυλίσματα τα βέλτιστα είναι τα E/EtOH-H₂O και E/Bet:LA:W όσον αφορά στην αντιοξειδωτική του δράση.

3.2.2 Ολικό φαινολικό περιεχόμενο (Total Phenolic Content, TPC) των εκχυλισμάτων

Η μέτρηση των φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων ακολουθεί το διαχωρισμό σε πρώτο και δεύτερο μέρος, όπως στην αντιοξειδωτική δράση.

Α' Μέρος

Στον πίνακα 22 γίνεται καταγραφή της συγκέντρωσης των εκχυλισμάτων σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος και η περιεκτικότητα φαινολικών (TPC) ανά μονάδα εκχυλιζόμενης μάζας τζίντζερ.

Πίνακας 22. Αποτελέσματα ολικού φαινολικού φορτίου των εκχυλισμάτων διαφορετικών μορφών τζίντζερ.

Κωδικός εκχυλίσματος	Συγκέντρωση σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (mg _{gal} /mL)	TPC (mg _{GAL} /g _{ginger})
GT ₁	0.802±0.002	19.19±0.04
GT ₂	0.434±0.051	8.64±0.99
GT ₃	0.429±0.019	8.59±0.37
GT ₄	0.681±0.029	15.76±0.68

Από τα παραπάνω αποφαίνεται πως το εκχύλισμα GT₁ εμφανίζει τόσο την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση όσο και το μέγιστο περιεχόμενο σε φαινολικά. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί

από το γεγονός ότι το μικρό μέγεθος κόκκων του βελτιώνει γενικά τη διεργασία της εκχύλισης, όπως περιγράφεται στο κομμάτι της αντιοξειδωτικής δράσης. Στη συνέχεια, ανάμεσα στα εκχυλίσματα με φρέσκο τζίντζερ, τα περισσότερα φαινολικά περιέχει αυτό με το μικρότερο μέγεθος κόκκων. Είναι λογικό άλλωστε γιατί σε αυτή την περίπτωση διευκολύνονται τα φαινόμενα μεταφοράς του διαλύτη και των φαινολικών ενώσεων στο εσωτερικό των κόκκων. Τέλος, η αραίωση του Bet:LA:W με επιπρόσθετο νερό δεν έχει σοβαρό αντίκτυπο στο περιεχόμενο των φαινολικών του εκχυλίσματος, όπως φαίνεται. Πάντως διατηρείται η υπεροχή του εκχυλίσματος από ξηρό τζίντζερ για τις δεδομένες συνθήκες.

B' Μέρος

Πίνακας 23. Αποτελέσματα ολικού φαινολικού φορτίου των εκχυλισμάτων ξηρού τζίντζερ.

Κωδικός εκχυλίσματος	Συγκέντρωση σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (mg _{gal} /mL)	TPC (mg _{GAL} /g _{ginger})
<i>E/Bet: LA: W</i>	0.534±0.011	12.10±0.26
<i>E/Glu: LA: W (1: 6: 6. 2)</i>	0.621±0.011	10.43±0.18
<i>E/Bet: Gly</i>	0.470±0.028	7.62±0.46
<i>E/Bet: Gly: W(1: 3: 1)</i>	0.560±0.021	12.98±0.48
<i>E/Bet:Gly:W (1:3:3.33)</i>	0.873±0.030	20.48±0.72
<i>E/EtOH: H₂O</i>	0.361±0.058	9.94±1.60
<i>E/H₂O</i>	0.201±0.083	4.77±0.77
<i>E/EtOH</i>	0.223±0.059	6.78±1.80

Από τα αποτελέσματα για το δεύτερο μέρος εκχυλίσεων αποφαίνεται ότι το E/Bet:Gly:W (1:3:3.33) περιέχει τις περισσότερες φαινολικές ενώσεις.

Ανάμεσα στα εκχυλίσματα E/Bet:LA:W, E/Glu:LA:W και E/Bet:Gly:W (1:3:3.33) που έχουν την ίδια ποσοστιαία αναλογία σε νερό οι διαλύτες, καλύτερο αποφαίνεται το τελευταίο. Ανάμεσα στα εκχυλίσματα E/Bet:Gly, E/Bet:Gly:W (1:3:1), E/Bet:Gly:W (1:3:3.33) ο NADES που χρησιμοποιείται είναι ο ίδιος και αυτό που αλλάζει είναι η περιεκτικότητά του σε νερό. Από τις προκύπτουσες τιμές φαίνεται ότι όσο αυξάνεται η αναλογία νερού/Bet:Gly τόσο αυξάνεται και το περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις, ενώ προηγουμένως ευρέθη πως η τιμή του IC₅₀ ελαττώνεται. Σημειώνεται ότι το E/Bet:LA:W, που έδειξε την καλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα μεταξύ των εκχυλισμάτων με NADES, παρουσιάζει και ικανοποιητικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις.

Από την άλλη το E/H₂O έχει το χαμηλότερο φαινολικό περιεχόμενο που δικαιολογείται από το γεγονός ότι η πολικότητα των φαινολικών στο τζίντζερ δεν είναι μονοσήμαντη και το νερό όντας πολικό και δεν έχει ισχυρή εκχυλιστική ικανότητα των μη πολικών ενώσεων.

Έτσι, εμφανίζει τη χαμηλότερη εκχυλιστική ικανότητα από όλους τους μελετούμενους διαλύτες. Επίσης, χαρακτηριστικό είναι πως το E/EtOH που εμφάνιζε καλή αντιοξειδωτική δράση, παρουσιάζει χαμηλότερο φορτίο σε φαινολικές ενώσεις σε σχέση με τα εκχυλίσματα των NADESs. Βέβαια, ο συνδυασμός αιθανόλης και νερού οδηγεί σε υψηλότερο φαινολικό φορτίο από ότι τα εκχυλίσματα των καθαρών επιμέρους διαλυτών. Φαίνεται, λοιπόν, το μοτίβο να επαναλαμβάνεται και, όπως στην αντιοξειδωτική δράση, ο συνδυασμός αιθανόλης και νερού ως εκχυλιστικό μέσο ενισχύει την απομόνωση φαινολικών ουσιών. Η αιθανόλη και το νερό λειτουργούν, ενδεχομένως, συνεργιστικά σε όλη τη διαδικασία της εκχύλισης. Παρόλα αυτά, πάλι τα εκχυλίσματα με NADES υπερτερούν στο φαινολικό περιεχόμενο.

Παρατηρήσεις από τη συγκριτική μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης και του φαινολικού περιεχομένου του δεύτερου μέρους εκχυλίσεων

Αρχικά, η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των καθαρών διαλυτών έδειξε πως δε συνεισφέρουν στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων. Όπως έχει επισημανθεί αρκετές φορές στη θεωρία, οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες αποτελούν άριστα μέσα για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων, όχι μόνο λόγω του υψηλού εκχυλιστικού δυναμικού τους, αλλά και καθώς λειτουργούν προστατευτικά και σταθεροποιητικά για τις ενώσεις που εκχυλίζουν. Από τα αποτελέσματα επιβεβαιώνεται ότι όλα τα εκχυλίσματα με NADES φέρουν πολύ καλή αντιοξειδωτική δράση, ενώ εμφανίζουν και ικανοποιητικό φαινολικό περιεχόμενο. Η αύξηση της αναλογίας νερού/NADES στο διαλύτη εκχύλισης φαίνεται πως αυξάνει την περιεκτικότητα του εκχυλίσματος σε φαινολικά. Από την άλλη η αύξηση της αναλογίας μπορεί να μειώσει την τιμή IC₅₀ (καλύτερη αντιοξειδωτική δράση) για χαμηλούς χρόνους εκχύλισης ή να την αυξήσει για μεγαλύτερους χρόνους εκχύλισης. Ενδεχομένως, η αραίωση του διαλύτη με νερό να μειώνει το ιξώδες και σε εκχυλίσεις σύντομου χρόνου, όπου τα φαινόμενα μεταφοράς παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο, να επιτυγχάνεται γρηγορότερη απομόνωση αντιοξειδωτικών, ενώ σε μεγαλύτερου χρόνου εκχυλίσεις που τα φαινόμενα μεταφοράς δεν είναι τόσο κυριαρχικά για το αποτέλεσμα της εκχύλισης να μην επηρεάζει σημαντικά η αραίωση. Πάντως, φαίνεται πως αυξημένο φαινολικό περιεχόμενο δε συνεπάγεται κατ' ανάγκη και καλύτερη αντιοξειδωτική δράση. Αναντίρρητα, οι φαινολικές ενώσεις είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά, αλλά υπάρχουν δύο σημαντικές παράμετροι για την αποτελεσματικότητα της δράσης τους. Η πρώτη παράμετρος είναι πως οι διάφορες φαινολικές ενώσεις μπορεί να έχουν όμοια δομή, όμως οι υποκαταστάτες (πχ υδροξύλια, μεθοξύλια κλπ.) που φέρουν ποικίλουν και η θέση και η φύση τους συνδέεται άρρηκτα με τη δράση της ένωσης. Ο δεύτερος παράγοντας είναι πως στα εκχυλίσματα δεν υπάρχει μόνο ένα είδος φαινολικής ένωσης, αλλά ένα συνονθύλευμα φαινολικών ενώσεων. Τα διαφορετικά φαινολικά μόρια αλληλεπιδρούν συνεργιστικά ή και ανταγωνιστικά μεταξύ τους. Εάν επικρατούν μηχανισμοί ανταγωνισμού, τότε η συνολική αντιοξειδωτική δράση των ενώσεων φθίνει. Συνεπώς, η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων επηρεάζεται άμεσα από την ποιότητα και

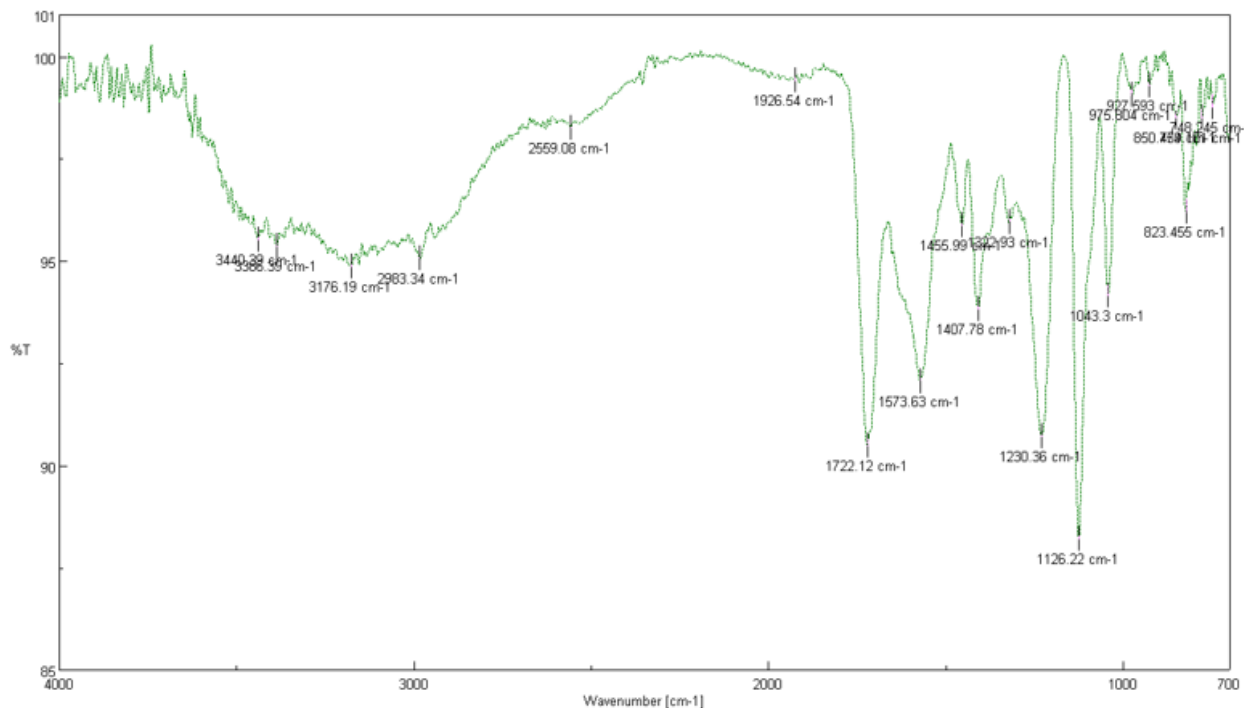
την αλληλεπίδραση των πολυφαινολών και ένα υψηλό φαινολικό φορτίο δε μεταφράζεται απαραίτητα σε υψηλή αντιοξειδωτική δράση.

Επιπλέον, από τα αποτελέσματα απορρέει ότι ο συνδυασμός αιθανόλης και νερού ως διαλύτης εκχύλισης ενισχύει την αντιοξειδωτικότητα και το φαινολικό φορτίο των εκχυλισμάτων σε σχέση με τα εκχυλίσματα των αντίστοιχων καθαρών διαλυτών. Αυτό που πρέπει να προστεθεί είναι ότι το φαινολικό φορτίο των εκχυλισμάτων με αιθανόλη και νερό είναι σαφώς μικρότερο από των εκχυλισμάτων με NADES. Αυτό μπορεί να συμβαίνει από το γεγονός ότι οι NADESs λειτουργούν ως προστατευτικά μέσα των φαινολών και άρα, κατά την αποθήκευση των εκχυλισμάτων οι φαινολικές ενώσεις να διατηρούνται με την αρχική δραστηριότητά τους.

Τέλος, οι όποιες διαφοροποιήσεις σε φαινολικό περιεχόμενο αποτυπώνονται και οπτικά στα εκχυλίσματα. Ανάλογα με ποιες και πόσες φαινολικές ενώσεις έχει εκχύλισει ο εκάστοτε διαλύτης, το εκχύλισμα λαμβάνει και διαφορετικό χρώμα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 17. Από τα γραφήματα των φασμάτων IR για τα εκχυλίσματα (Παράρτημα II) φαίνεται πως ο κάθε διαλύτης έχει την ικανότητα να διαλύει διαφορετικές φαινολικές ενώσεις και να αλληλεπιδρά με αυτές με διαφορετικό τρόπο και ισχύ.

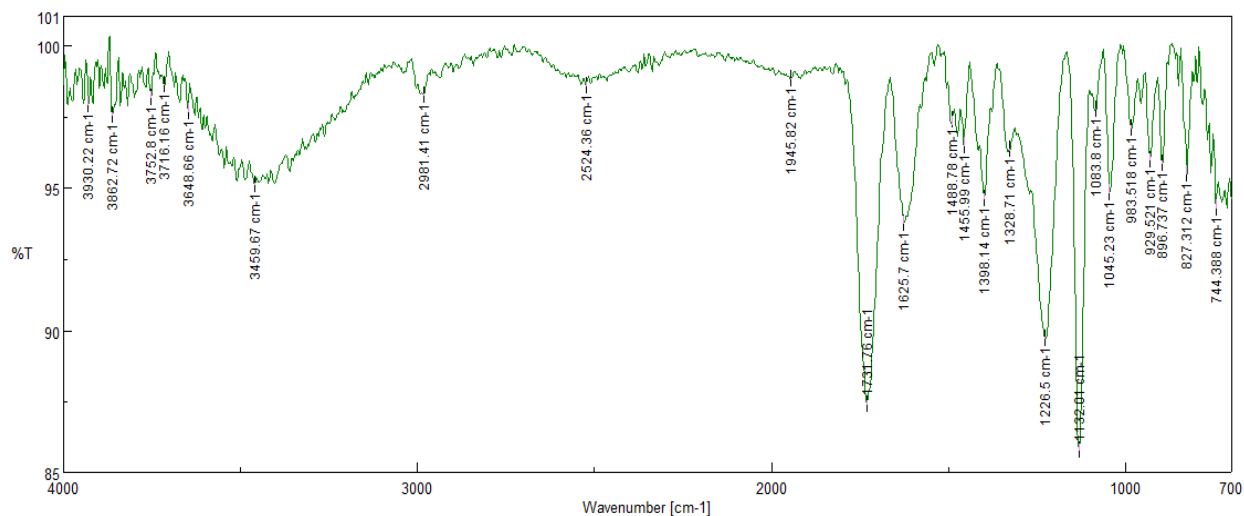
3.2.3 Χαρακτηρισμός του εκχυλίσματος E/Bet:LA:W μέσω φασματοσκοπίας υπέρυθρου (FTIR-ATR)

Στα γραφήματα που ακολουθούν γίνεται σύγκριση των φασμάτων FT-IR (ATR) του NADES Bet:LA (1:2) και του εκχυλίσματος τζίντζερ αυτού, E/Bet:LA:W. Επιλέχθηκε αυτό το εκχύλισμα καθώς εμφανίζει πολύ καλή αντιοξειδωτική δράση για χρόνο επώασης μίας και δύο ωρών, έχει ικανοποιητικό φορτίο φαινολικών ενώσεων και είναι αυτό που μελετάται εκτενέστερα. Όπως θα φανεί και στη συνέχεια, οι κορυφές του διαλύτη γενικά υπερτερούν των κορυφών των ενώσεων του εκχυλίσματος. Επίσης, το εκχύλισμα περιέχει πληθώρα ενώσεων του τζίντζερ, το πλήθος και η ταυτότητα των οποίων δεν είναι γνωστά. Αυτά καθιστούν τον χαρακτηρισμό των εκχυλισμάτων μέσω IR δύσκολο. Εκεί που δίνεται ιδιαίτερη βαρύτητα είναι η σύγκριση στις κορυφές του καθαρού διαλύτη και του διαλύτη με τις εκχυλισμένες ενώσεις, καθώς η ύπαρξη αλληλεπιδράσεων μπορεί να αποτυπωθεί με μετατοπίσεις στις κορυφές των χαρακτηριστικών ομάδων.



Γράφημα 8. Φάσμα FTIR (ATR) για το Bet:LA (1:2).

Στο φάσμα του διαλύτη παρατηρείται ευρεία κορυφή στο εύρος $2500\text{-}3550\text{cm}^{-1}$ που οφείλεται σε επιμέρους χαρακτηριστικές ομάδες του NADES. Η κορυφή αυτή οφείλεται σε συνδυασμό της αλληλεπίδρασης μεταξύ του O^- της βεταΐνης και της $-\text{OH}$ ομάδας του γαλακτικού οξέος, καθώς και σε δονήσεις τάσεις του υδροξυλίου του γαλακτικού οξέος. Επίσης, φαίνεται στην κορυφή αυτή ανήκουν και οι δονήσεις τάσης του υδροξυλίου της καρβοξυλομάδας του γαλακτικού οξέος (2983.34cm^{-1}). Στη συνέχεια, στα 1722.12cm^{-1} εμφανίζεται κορυφή λόγω των δονήσεων τάσης των δεσμών $\text{C}=\text{O}$ του καρβοξυλικού οξέος και στα 1573.53cm^{-1} λόγω δονήσεων τάσης του καρβονυλίου της βεταΐνης.



Γράφημα 9. Φάσμα FTIR (ATR) για το εκχύλισμα E/Bet:LA:W.

Στο γράφημα αποτυπώνονται οι κορυφές του εκχυλίσματος E/Bet:LA:W και παρουσιάζονται διαφορές συγκριτικά με το φάσμα του διαλύτη. Κατ' αρχάς, η κορυφή στους κυματαριθμούς άνω των 3000cm^{-1} δεν είναι τόσο ευρεία και έχει πλέον εύρος $3000\text{-}3600\text{cm}^{-1}$. Ενώ στο φάσμα του διαλύτη η κορυφή αυτή ήταν ενιαία για τις δονήσεις τάσεις όλων των υδροξυλίων του συστήματος, στο φάσμα του εκχυλίσματος η κορυφή των δονήσεων τάσης του υδροξυλίου του γαλακτικού οξέος φαίνεται να είναι ξεχωριστή (2991.41cm^{-1}) και μάλιστα αρκετά μικρότερης έντασης σε σχέση με την ένταση της κορυφής στα 3459.67cm^{-1} σε αντίθεση με το διαλύτη. Η κορυφή στα 1731.76cm^{-1} αντιστοιχεί πάλι σε δονήσεις τάσης των δεσμών $\text{C}=\text{O}$ τόσο του διαλύτη όσο και των εκχυλισμένων ενώσεων. Φαίνεται, άλλωστε, πως η έντασή της είναι ενισχυμένη σε σχέση με τις υπόλοιπες κορυφές του φάσματος και πιθανότατα οφείλεται στην αύξηση του αριθμού των καρβονυλίων σε σχέση με τον καθαρό διαλύτη, αφού οι ενώσεις του τζίντζερ (πχ. σογκαόλες) περιέχουν πολλούς τέτοιους δεσμούς. Η ξεκάθαρη, επίσης, μετατόπισή της μπορεί να ερμηνευτεί από την αλληλεπίδραση μεταξύ διαλύτη και εκχυλισμένων ενώσεων. Η κορυφή στα 1625.7cm^{-1} δεν εμφανιζόταν στο φάσμα του διαλύτη και ίσως οφείλεται στη δόνηση τάσης των δεσμών $\text{C}=\text{C}$ που απαντώνται στα μόρια των εκχυλισμένων ενώσεων. Ενδεχομένως στην περιοχή 1455cm^{-1} να αποτυπώνονται και στο διαλύτη και στο εκχύλισμα οι δονήσεις τάσης των δεσμών $\text{C}-\text{H}$ των μεθυλίων, ενώ στα 1398.14cm^{-1} να αποτυπώνονται οι δονήσεις κάμψης του $\text{O}-\text{H}$ του οξέος. Η ενίσχυση των κορυφών στα 1226.5cm^{-1} και 1132.01cm^{-1} μπορεί να οφείλεται σε δονήσεις δεσμών $\text{C}-\text{OH}$ και $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ που υπάρχουν στις εκχυλισμένες ενώσεις.^[109]

Γενικά, φαίνεται πως το φάσμα του εκχυλίσματος διαφέρει σε σχέση με του διαλύτη. Η εκτεταμένα ευρεία κορυφή στο εύρος $2500\text{-}3550\text{cm}^{-1}$ αντικαθίσταται από μία λιγότερο ευρεία στο $3000\text{-}3600\text{cm}^{-1}$. Η κορυφή λόγω δόνησης τάσης των καρβονυλίων εμφανίζεται με ενισχυμένη ένταση και ελαφρώς μετατοπισμένη (1731.76cm^{-1}) σε υψηλότερους κυματαριθμούς από ότι στο διαλύτη (1722.12cm^{-1}). Η κορυφή στα 1625cm^{-1} εμφανίζεται μόνο στο

εκχύλισμα, ενώ οι κορυφές που αντιστοιχούν σε απορροφήσεις C=C αρωματικού δακτυλίου, C-O, δηλαδή σε κυματαριθμούς μικρότερους από 1450cm^{-1} είναι ελαφρώς μετατοπισμένες. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι κορυφές του διαλύτη εμφανίζουν μειώσεις στην ένταση, ενισχύσεις ή μετατοπίσεις. Οι παρατηρούμενες μετατοπίσεις αποτελούν μία ένδειξη αλληλεπίδρασης των χαρακτηριστικών ομάδων του διαλύτη με τις εκχυλισμένες ενώσεις του τζίντζερ.

Το εκχύλισμα περιέχει πληθώρα ενώσεων, που δεν έχουν όμως ταυτοποιηθεί μία προς μία. Επομένως, αν και αλληλεπιδρούν με το διαλύτη, δεν μπορεί να εξαχθεί συμπέρασμα για το αν η αλληλεπίδραση αυτή καθορίζει να είναι διαλυμένες σε δομή διαφορετική από αυτή που απαντώνται στην πρώτη ύλη.

3.2.4 Χαρακτηρισμός φιλμ χιτοζάνης

Τα φιλμ χιτοζάνης συντέθηκαν με τη χρήση NADES, εκχυλισμάτων με διαλύτη NADES και ιοντικά υγρά. Τα αναφερόμενα λειτουργούν σαν πλαστικοποιητές και ενισχύουν της φυσικοχημικές ιδιότητες των φιλμ. Ο χαρακτηρισμός τους αφορά σε μετρήσεις βάρους, πάχους και διαπερατότητας σε υδρατμούς.

3.2.4.1 Μέτρηση Βάρους και γενικά χαρακτηριστικά φιλμ

Η ενότητα αυτή χωρίζεται σε δύο μέρη. Στο πρώτο μέρος αναλύονται τα φιλμ των NADESs και των εκχυλισμάτων και στο δεύτερο τα φιλμ των ιοντικών υγρών.

A' Μέρος

Στο μέρος αυτό έγινε μια γενική αποτίμηση της χρήσης NADES ως πλαστικοποιητή σε διάφορες αναλογίες με την περιεκτικότητα σε χιτοζάνη να είναι σταθερή και ίση με 0.2% κατά βάρος.

Κατ' αρχάς, τα υδατικά διαλύματα των NADESs και των εκχυλισμάτων τους οφείλουν να είναι αρκετά όξινα για να μπορούν να διαλύσουν τη χιτοζάνη. Αποδεικνύεται πως για περιεκτικότητα υδατικού διαλύματος 0.5% κατά βάρος Bet:LA:W το pH είναι κοντά στην τιμή 3 και όσο τη περιεκτικότητα σε Bet:LA:W αυξάνει τόσο το pH ελαττώνει κι άλλο. Αυτό συμβαίνει και με το Glu:LA:W. Συνεπώς, οι δύο αυτοί NADESs δημιουργούν όξινα υδατικά διαλύματα, στα οποία η χιτοζάνη διαλύεται χωρίς την προσθήκη άλλου οξέος, όπως συνήθως οξικό οξύ. Από την άλλη, το Bet:Gly δημιουργεί βασικά υδατικά διαλύματα όπου η χιτοζάνη είναι αδιάλυτη και συνεπώς, απαιτείται η χρήση οξικού οξέος για τη ρύθμιση του pH σε χαμηλές τιμές. Τα δεδομένα για το βάρος των φιλμ παρουσιάζονται στον πίνακα 24.

Πίνακας 24. Αποτελέσματα βάρους φιλμ με ενίσχυση NADESs και εκχυλισμάτων αυτών. Το σφάλμα μέτρησης του ζυγού ανέρχεται σε $\pm 0.2\text{mg}$.

Βάρος σε mg			
Κωδικός Φιλμ	Περιεχόμενο	t=0	t=18μέρες
F ₁	1% Οξικό οξύ	121.2	118.9
F ₂	1% Bet:LA:W	457.3	446.3
F ₃	3% Bet:LA:W	1207.0	-
F ₄	6% Bet:LA:W	-	-
F ₅	10% Bet:LA:W	-	-
F ₆	0.5% Bet:LA:W	270.2	-
F ₇	3% Bet:LA:W	1230.0	-
F ₈	0.5% E/Bet:LA:W	258.9	259.0
F ₉	1% E/Bet:LA:W	452.9	-
F ₁₀	1% GT1	442.5	417.4
F ₁₁	0.5% E/Bet:Gly	214.0	186.5
F ₁₂	0.5% E/Glu:LA:W	291.2	287.5

Γενικές παρατηρήσεις

Αρχικά, το φιλμ F₁ συντέθηκε με τη χρήση οξικού οξέος για τη διάλυση της χιτοζάνης και λειτουργεί πρακτικά ως «τυφλό» φιλμ για τη σύγκριση των ιδιοτήτων με άλλα φιλμ που χρησιμοποιούνται οι νέοι πλαστικοποιητές. Το φιλμ αυτό είναι διαυγές με ελαφρώς υποκίτρινο χρωματισμό, ενώ δεν είναι ελαστικό αλλά εύθρυπτο.

Στη συνέχεια, τα φιλμ F₂ έως F₇ συντίθενται με τη χρήση Bet:LA:W ως διαλυτικό μέσο και πλαστικοποιητή. Ανάμεσα στα φιλμ μεταβάλλεται η περιεκτικότητα σε Bet:LA:W, ενώ τα F₆ και F₇ έχουν ξηρανθεί επιπρόσθετα σε φούρνο μέχρι σταθερού βάρους. Παρατηρείται ότι η χρήση Bet:LA:W αντί οξικού οξέος, αρχικά προσδίδει εντονότερο κίτρινο χρώμα και τα φιλμ είναι σαφώς πιο ελαστικά και εύκαμπτα. Επίσης, όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα σε Bet:LA:W τόσο αυξάνεται η ελαστικότητα του φιλμ, όμως γίνεται και πιο κολλώδες και η διαχείρισή του είναι δυσκολότερη, καθώς υπάρχει κίνδυνος να «κολλήσουν» μεταξύ τους τα μέρη του και να χάσει το αρχικό κυκλικό σχήμα που έχει αποκτήσει από το κρυσταλλωτήριο. Ακόμα, για την περιεκτικότητα χιτοζάνης που χρησιμοποιήθηκε, τα φιλμ 6% και 10% κατά βάρος σε Bet:LA:W δε σχηματίστηκαν, γιατί η περιεκτικότητα σε Bet:LA:W ήταν αρκετά υψηλή και σε προφανή περίσσεια σε σχέση με τα υπόλοιπα μέρη σύνθεσης του φιλμ (χιτοζάνη, νερό). Τα φιλμ F₂, F₆ είναι συμπαγή και ελαστικά, ενώ το F₇ είναι πολύ ελαστικό και αρκετά κολλώδες.

Έπειτα, τα φιλμ F₈ έως F₁₂ είναι ενισχυμένα με εκχυλίσματα. Ανάμεσα στα εκχυλίσματα E/Bet:LA:W και E/Glu:LA:W, τα φιλμ F₈ και F₁₂ αντίστοιχα εμφανίζουν αντίστοιχες ιδιότητες στην όψη και την ελαστικότητα. Τα φιλμ αυτά είναι κίτρινου χρώματος, συμπαγή και

εύκαμπτα που τα κάνει να διαφέρουν από το σχετικά άκαμπτο φιλμ του οξικού οξέος. Σε αντιπαραβολή βρίσκεται το F₁₁ ενισχυμένο με το εκχύλισμα E/Bet:Gly. Επειδή το υδατικό διάλυμά του είναι βασικό, η χρήση οξικού οξέος επηρέασε τις τελικές ιδιότητες του φιλμ. Αρχικά, το φιλμ είναι σαφώς εύθρυπτο και άκαμπτο. Κατά δεύτερον, το χρώμα του είναι βαθύ καφέ και το κάνει να ξεχωρίζει σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα. Η αλλαγή του χρώματος ενδεχομένως έχει να κάνει με την οξείδωση της γλυκερόλης με πιο πιθανό πρώτο υποπροϊόν τη γλυκεραλδεϋδη. Οι ιδιότητές του αυτές υποβαθμίζουν το φιλμ του εκχυλίσματος E/Bet:Gly συγκριτικά με τα φιλμ των υπόλοιπων εκχυλισμάτων. Η ανάγκη χρήσης οξέος για τη διάλυση της χιτοζάνης επηρεάζει κυριαρχικά τις ιδιότητες του F₁₁ και δείχνει πως μάλλον δε δύνανται να αξιοποιηθούν οι πλαστικοποιητικές ιδιότητες του διαλύτη του εκχυλίσματος E/Bet:Gly.



Εικόνα 20. Από αριστερά προς τα δεξιά: 1. Φιλμ χιτοζάνης F₁ με οξικό οξύ, 2. Φιλμ χιτοζάνης F₉ με 1% w/v εκχύλισμα E/Bet:LA:W, 3. Φιλμ χιτοζάνης F₁₁ με 0.5% w/v E/Bet:Gly και οξικό οξύ

Παρατηρήσεις για το βάρος των εκχυλισμάτων

Θεωρητικά το βάρος των σχηματιζόμενων φιλμ αντιστοιχεί στα αρχικά συστατικά του φιλμ που δεν εξατμίζονται κατά την παραμονή στο υδατόλουτρο και είναι αυτά που δημιουργούν το «πλέγμα» του φιλμ. Ουσιαστικά, το βάρος θα πρέπει να ισούται με το σύνολο του βάρους της διαλυμένης χιτοζάνης και του πλαστικοποιητή του διαλύματος που προορίζεται για εξατμισμό στα κρυσταλλωτήρια. Επίσης, σε αυτό το βάρος μπορεί να συμμετέχουν και ορισμένα μόρια νερού (υγρασίας).

Για παράδειγμα, κατά το σχηματισμό του F₂ θα εξατμιστεί το νερό του διαλύματος και το νερό που περιείχε αρχικά ο Bet:LA:W (περίπου 15% κατά βάρος). Έτσι, στο φιλμ θα παραμείνει ο Bet:LA και η χιτοζάνη. Στα 100mL διαλύματος προστέθηκαν 1000mg Bet:LA:W (850mg Bet:LA) και 200mg χιτοζάνης. Τα 45mL που χρησιμοποιήθηκαν για το σχηματισμό

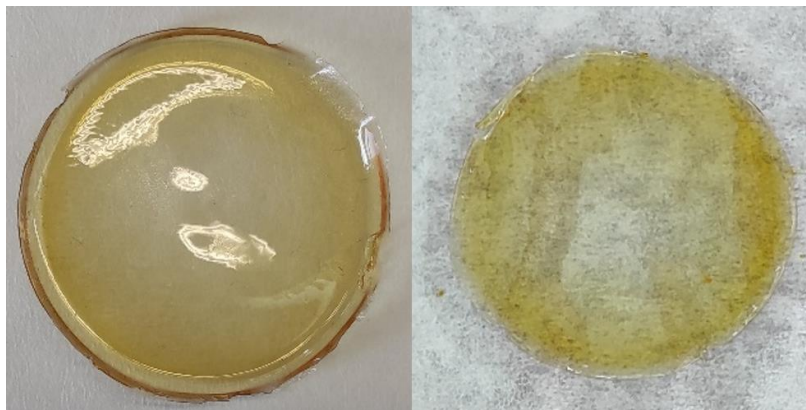
του φιλμ θα δώσουν φιλμ με βάρος: $0.45 \cdot (850 + 200) \approx 470\text{mg}$. Επίσης, για το F₇ το αναμενόμενο βάρος είναι περίπου 1230mg. Από τα αποτελέσματα, λοιπόν, φαίνεται πως το βάρος των φιλμ που προκύπτει είναι όντως όμοιο με το αναμενόμενο βάρος και εξαρτάται από την περιεκτικότητα σε πλαστικοποιητή και χιτοζάνη. Οι διαφορές που μπορεί να προκύπτουν στα βάρη οφείλονται είτε σε απώλειες κατά την αποκόλληση του φιλμ, είτε σε σφάλματα κατά την παρασκευή του, είτε σε σφάλματα κατά τη ζύγιση. Τις μεγαλύτερες απώλειες εμφανίζει το F₁₁, όπου χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον οξύ και η διαχείρισή του λόγω της ευθρυπτότητας (άκαμπτη πλαστικότητα) ήταν δυσκολότερη.

Παρατηρείται ότι αύξηση στην περιεκτικότητα σε NADES ή εκχύλισμα αυξάνει το βάρος του σχηματιζόμενου φιλμ, όπως εξηγήθηκε προηγουμένως. Επίσης, ορισμένα από τα φιλμ επαναζυγίστηκαν μετά την πάροδο 18 ημερών και παρατηρήθηκε ότι σχεδόν όλα τα φιλμ διατηρούν το βάρος τους και δεν αλλοιώνονται. Μόνο στα φιλμ F₁₀, F₁₁ παρατηρήθηκε μείωση στο βάρος, που όσον αφορά στο F₁₁ μπορεί να οφείλεται και σε απώλεια λόγω της ευθρυπτότητάς του (μικρά σπασμένα κομματάκια να χάθηκαν).

B' Μέρος

Σε αυτό το μέρος, διενεργήθηκε μία προκαταρκτική μελέτη για τη χρήση του IY₁: Choline Hydroxide:Levulinic Acid (1:1) και του CAGE (1:2) ως πλαστικοποιητές σε φιλμ χιτοζάνης.

Αρχικά, το υδατικό διάλυμα 1% κατά βάρος IY₁ έχει pH=5.20 που δεν είναι αρκετά χαμηλό για τη διάλυση της χιτοζάνης. Οπότε στο F₁₃ η πρόσθεση επιπλέον 1% κατ' όγκο λεβουλινικού οξέος μείωσε το pH ώστε να διαλυθεί η χιτοζάνη, ενώ στο F₁₃ αρχικά έγινε διάλυση χιτοζάνης σε 1% κατ' όγκο διάλυμα οξικού οξέος και ύστερα προστέθηκε το IY₁. Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως το F₁₃ είναι αισθητά πιο βαρύ, παχύ και εύκαμπτο, ενώ το F₁₄ εμφανίζει ευθρυπτότητα πάλι λόγω του οξικού οξέος. Από τις μετρήσεις βάρους συμπεραίνεται πως κατά την πάροδο χρόνου υπάρχει διαρροή του φιλμ. Δηλαδή φαίνεται ξεκάθαρα τόσο οπτικά όσο και στο βάρος, ότι το φιλμ συρρικνώνεται. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διαρροή του ιοντικού υγρού από το φιλμ ή και του πρόσθετου λεβουλινικού οξέος.



Εικόνα 21. F₁₄ μετά την Παρασκευή (αριστερά) και μετά την πάροδο 18 ημερών (δεξιά).

Το υδατικό διάλυμα 1% κατά βάρος CAGE (1:2) έχει pH=6.06 που δεν είναι αρκετά όξινα ώστε να διαλυθεί η χιτοζάνη. Άρα, και εδώ γίνεται χρήση οξικού οξέος. Στο F₁₅ το οξύ προστίθεται μετά την προσθήκη του CAGE (1:2), ενώ στο F₁₆ το CAGE (1:2) προστίθεται σε υδατικό διάλυμα οξικού οξέος αφότου έχει διαλυθεί η χιτοζάνη. Και τα δύο σχηματιζόμενα φιλμ είναι ανομοιογενή τόσο στην υφή όσο και στο χρώμα, ενώ παράλληλα παρατηρείται μείωση στο βάρος τους κατά την πάροδο του χρόνου, μάλλον λόγω διαρροής του CAGE (1:2). Η χρήση οξικού οξέος ίσως ευθύνεται για την έλλειψη ευκαμψίας, ενώ το F₁₆ είναι ελάχιστα πιο εύθρυπτο.



Εικόνα 22. Αριστερά: F₁₅ Φιλμ CAGE (1:2) με προσθήκη οξικού οξέος μετά το CAGE. Δεξιά: F₁₆ Φιλμ CAGE (1:2) με προσθήκη χιτοζάνης σε διάλυμα οξικού οξέος.

Πίνακας 25. Αποτελέσματα βάρους φιλμ ιοντικών υγρών. Το σφάλμα μέτρησης του ζυγού ανέρχεται σε $\pm 0.2\text{mg}$.

Κωδικός	Βάρος σε mg	
	t=0	t=18μέρες
F ₁₃	801.8	648.0
F ₁₄	598.4	421.5
F ₁₅	383.3	295.6
F ₁₆	378.1	233.8

Από τα αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση της χρήσης τους ως πλαστικοποιητές, η οποία δεν πραγματοποιείται στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

3.2.4.2 3.2.4.2 Πάχος φιλμ

Από τα αποτελέσματα που έχουν ανακύψει έως τώρα αποφαίνεται πως το καλύτερο εκχύλισμα για χρήση ως ενίσχυση φιλμ χιτοζάνης είναι το E/Bet:LA:W, καθώς εμφανίζει την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση συγκριτικά με τα εκχυλίσματα των υπόλοιπων NADESS και

έχει ικανοποιητικό φαινολικό φορτίο. Ενώ το E/Bet:Gly:W (1:3:3.33) έχει καλή αντιοξειδωτική δράση και το υψηλότερο φαινολικό φορτίο, δεν κρίνεται κατάλληλο για χρήση σε φιλμ χιτοζάνης με την τεχνική που χρησιμοποιήθηκε καθώς απαιτεί επιπρόσθετο οξύ για τη διάλυση της χιτοζάνης και το παραγόμενο φιλμ δεν έχει τα επιθυμητά χαρακτηριστικά.

Οπότε οι αναλύσεις θα αφορούν στα φιλμ F₂, F₆, F₇, F₈, F₉ που είναι ενισχυμένα με Bet:LA:W και το αντίστοιχο εκχύλισμα τζίντζερ. Τα αποτελέσματα πάχους δίνονται στον πίνακα 26.

Πίνακας 26. Αποτελέσματα πάχους των φιλμ.

Κωδικός	Περιεχόμενο	ΠΑΧΟΣ (mm)
F ₂	1% Bet:LA:W	0.210±0.033
F ₆	0.5% Bet:LA:W	0.091±0.028
F ₇	3% Bet:LA:W	0.402±0.018
F ₈	0.5% E/Bet:LA:W	0.129±0.024
F ₉	1% E/Bet:LA:W	0.156±0.032

Παρατηρείται ότι τα εκχυλίσματα της ίδιας περιεκτικότητας σε φιλμ εμφανίζουν κάποιες διαφορές στο πάχος. Για παράδειγμα, το F₂ με το F₉ θα αναμενόταν να είχαν παραπλήσιο πάχος, όμως, έχουν μια μικρή διαφορά. Το πάχος επηρεάζεται άμεσα από την μορφολογία και την ομοιογένεια της επιφάνειας των κρυσταλλωτηρίων, ενώ δεν είναι γνωστό και πως οι εκχυλισμένες ενώσεις μπορεί να το επηρεάσουν. Η διαφορά, όμως, καλύπτεται από το εύρος του σφάλματος, οπότε μπορεί πολύ απλά να οφείλεται αποκλειστικά και μόνος στο σφάλμα των μετρήσεων. Εξάλλου, γι' αυτό λήφθηκαν πολλές μετρήσεις πάχους για κάθε φιλμ για να απαλειφθεί το σφάλμα. Παρ' όλα αυτά, κάθε είδος φιλμ εμφάνιζε επαναληψιμότητα. Παραδείγματος χάρη, το F₉ αποτελεί το μέσο όρο από τέσσερα ίδια φιλμ που και οι μετρήσεις πάχους και βάρους δεν εμφάνιζαν σημαντικές αποκλίσεις, αντ' αυτού εμφάνιζαν αισιόδοξη σύγκλιση.

Γενικά, μπορεί να εκτιμηθεί πως όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα του φιλμ σε NADES ή εκχύλισμα τόσο θα αυξάνεται και το πάχος του φιλμ.

3.2.4.3 Διαπερατότητα Υδρατμών

Στον πίνακα 27 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της διαπερατότητας σε υδρατμούς και του ποσοστού μάζας νερού του διέρχεται διαμέσου των φιλμ F₂, F₆, F₇ και F₉.

Πίνακας 27. Αποτελέσματα διαπερατότητας υδρατμών και ποσοστού απώλειας νερού διαμέσου των φιλμ.

Κωδικός Φιλμ	Διαπερατότητα σε υδρατμούς ($10^{-8} \frac{g}{m \cdot \text{min} \cdot \text{Pa}}$)	$P_{\text{νερού}}$ (%)	
		μετά το πέρας 25 ωρών	μετά το πέρας 185.5 ωρών

F ₂	5.59	8.19	59.01
F ₆	2.52	8.85	61.49
F ₇	Διαλύθηκε μετά το πέρας της πρώτης ώρας		
F ₉	4.46	9.32	63.43

Όπως ήταν αναμενόμενο, τα φιλμ παρουσιάζουν διαπερατότητα σε υδρατμούς, καθώς ο Bet:LA μπορεί να αλληλεπιδράσει με το νερό, ώστε να μόρια νερού να συνδεθούν με αυτό εντός του φιλμ και να διέλθουν από την άλλη μεριά του φιλμ μέσω της διάχυσης. Γενικά, όσο πιο ογκώδης είναι δομικά το συστατικό του NADES στο χώρο, τόσο το πλέγμα που σχηματίζεται από την ανάπτυξη του δικτύου δεσμών υδρογόνου έχει περισσότερο κενό όγκο, αυξάνοντας τη διέλευση των μορίων του νερού. Το F₂ έχει διπλάσια περιεκτικότητα σε Bet:LA από ότι το F₉, αλλά εμφανίζει ελάχιστα μικρότερη διαπερατότητα σε υδρατμούς. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο πάχος του φιλμ, καθώς το F₂ έχει μεγαλύτερο πάχος και γι' αυτό, η δίοδος των ορίων του νερού να δυσχεραίνεται. Βέβαια, η απόκλιση είναι τόσο μικρή που δεν μπορούν να εξαχθούν πρόχειρα συμπεράσματα.

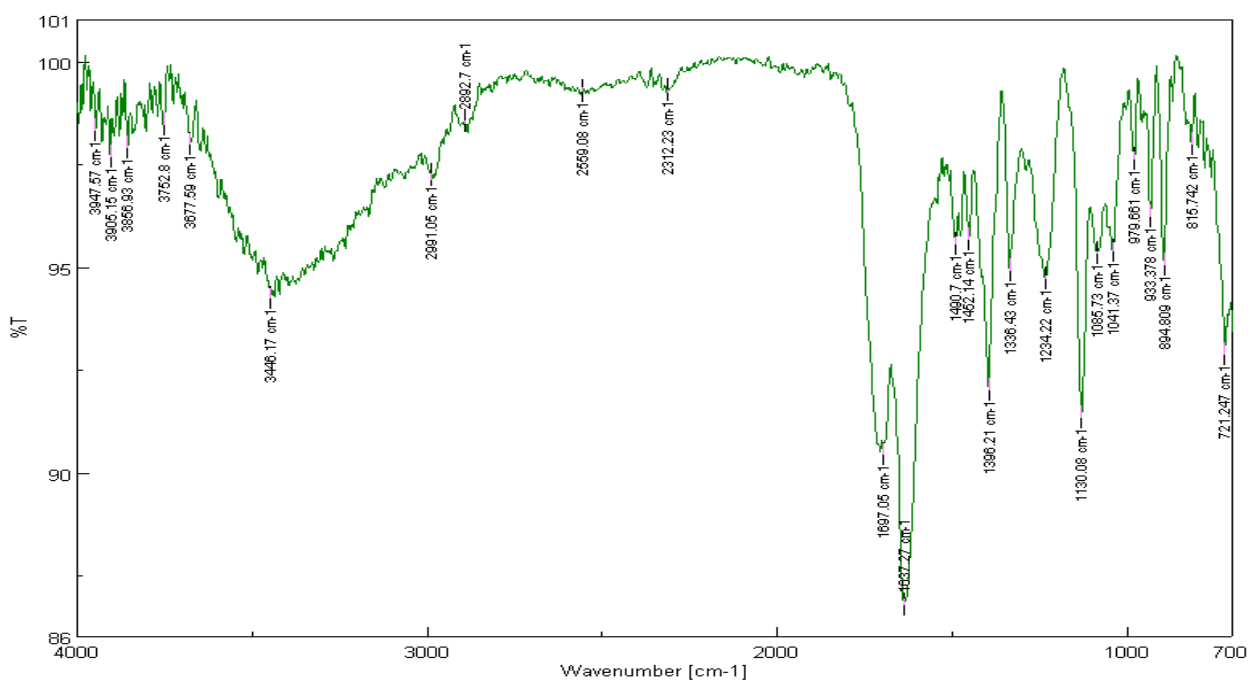
Συγκρίνοντας το F₂ με το F₉, το τελευταίο παρουσιάζει βελτιωμένη διαπερατότητα σε υδρατμούς. Ενώ έχουν ίδια περιεκτικότητα σε Bet:LA, το F₉ περιέχει και τις φαινολικές ενώσεις του τζίντζερ που έχουν εκχυλιστεί. Είναι πιθανό πως το φαινολικό φορτίο του F₉ αυξάνει τις διαθέσιμες υδροξυλομάδες του φιλμ και κατά συνέπεια, το φιλμ να αλληλεπιδρά περισσότερο με τα μόρια νερού μέσω δεσμών υδρογόνου και, άρα, τα μόρια νερού να διέρχονται από τη μία επιφάνεια του φιλμ στην άλλη με αυξημένο ρυθμό.

Τέλος, να σημειωθεί ότι το F₇ που περιείχε 3% κατά βάρος Bet:LA:W διαλύθηκε μετά το πέρας της πρώτης ώρας. Αυτό μπορεί να οφείλεται στον υγροσκοπικό χαρακτήρα και την ισχυρή αλληλεπίδραση του Bet:LA με τα διερχόμενα μόρια νερού, καθώς και στην μικρή περιεκτικότητα της χιτοζάνης για τη συγκεκριμένη περιεκτικότητα Bet:LA που έκανε το φιλμ λιγότερο συμπαγές.

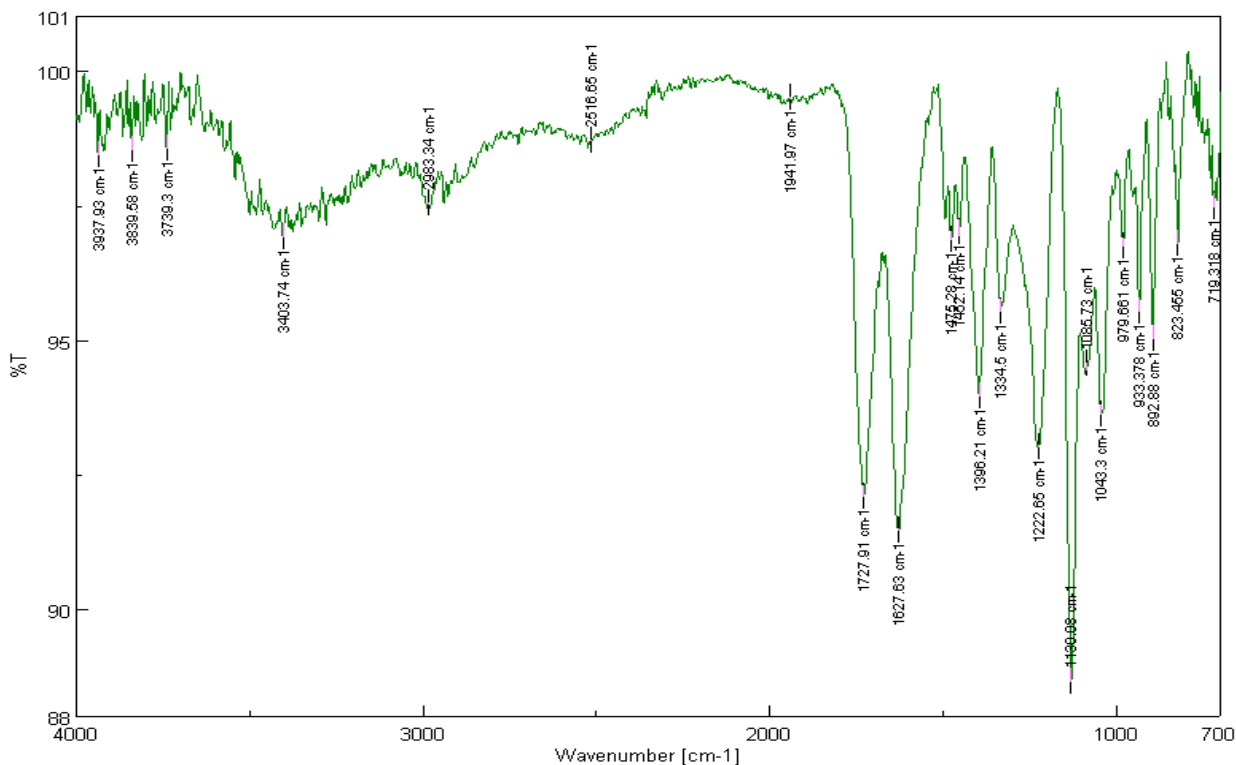
3.2.4.4 Χαρακτηρισμός φιλμ χιτοζάνης μέσω IR

Επιλέγεται η ανάλυση των φασμάτων FT-IR (ATR) των φιλμ χιτοζάνης που είναι ενισχυμένα με 1% w/v Bet:LA:W (F₂) και με 1% w/v εκχύλισμα E/Bet:LA:W. Τα δύο αυτά φιλμ συγκρίνονται ως προς τις κορυφές για τη διερεύνηση αλληλεπιδράσεων, όπως έχει ήδη γίνει και στο χαρακτηρισμό των εκχυλισμάτων στην Ενότητα 3.2.3. Η επιλογή των συγκεκριμένων φιλμ έγινε καθώς εμφανίζουν τις επιθυμητές ιδιότητες που πρέπει να έχει ένα φιλμ ανάλογα με τη χρήση, όπως συνεκτικότητα, ελαστικότητα, διαύγεια, διαπερατότητα σε υδρατμούς, αλλά και γιατί το εκχύλισμα αυτό εμφανίζει πολύ καλή αντιοξειδωτική δράση και ικανοποιητικό φαινολικό φορτίο. Στο Παράρτημα II παρατίθενται και τα φιλμ που είναι ενισχυμένα

με τον ίδιο NADES και εκχύλισμα σε διαφορετικές περιεκτικότητες, καθώς και φιλμ ενισχυμένα με τα υπόλοιπα συντιθέμενα εκχυλίσματα και ιοντικά υγρά.



Γράφημα 10. Φάσμα FTIR (ATR) φιλμ F2 ενισχυμένο με 1% w/v Bet:LA:W.



Γράφημα 11. Φάσμα FTIR (ATR) φιλμ F₉ ενισχυμένο με εκχύλισμα 1% w/v E/Bet:LA:W.

Στο ενισχυμένο με Bet:LA:W φιλμ (F₂) αποτυπώνεται ευρεία κορυφή στα 3446.17cm⁻¹ που οφείλεται σε δονήσεις τάσεις των δεσμών O-H τόσο του γαλακτικού οξέος όσο και ενδεχομένως του συνδυασμού O⁻ τη βεταΐνης με το γαλακτικό οξύ. Στο φιλμ που είναι ενισχυμένο με το εκχύλισμα E/Bet:LA:W (F₉) η κορυφή είναι σαφώς μικρότερης έντασης και ελαφρώς μετατοπισμένη σε χαμηλότερους κυματαριθμούς. Η κορυφή στα 2991.05cm⁻¹ αντιστοιχεί σε δονήσεις τάσης του OH του οξέος και εμφανίζεται ελαφρώς μετατοπισμένη σε χαμηλότερους κυματαριθμούς (2983.34cm⁻¹) στο φιλμ του εκχυλίσματος. Έπειτα, οι κορυφές στο F₂ στα 1697.05cm⁻¹ και 1637.27cm⁻¹ αντιστοιχούν σε δονήσεις τάσης C=O πιθανότατα του οξέος και της βεταΐνης αντίστοιχα. Στο φιλμ με το εκχύλισμα οι δύο αυτές κορυφές είναι μετατοπισμένες και ως εκ τούτου ξεχωρίζουν μεταξύ τους περισσότερο, ενώ παράλληλα η ένταση της δεύτερης (1627.63cm⁻¹) έχει μειωθεί συγκριτικά με τις υπόλοιπες κορυφές. Επιπλέον, εμφανίζεται αύξηση έντασης στις κορυφές 1130.08cm⁻¹ και 1222.65, ενώ εμφανίζεται μείωση στην 1043.3cm⁻¹. Ενδεχομένως η κορυφή στα 1130.08cm⁻¹ να αποδίδεται στην ασύμμετρη δόνηση τάσης των δεσμών C-O-C των εκχυλισμένων ενώσεων γι' αυτό και είναι ενισχυμένη και η κορυφή στα 1222.65cm⁻¹ σε δονήσεις τάσης των δεσμών C-N της βεταΐνης.

Γενικά, παρατηρείται ότι στα φάσματα των ενισχυμένων φιλμ χιτοζάνης υπερτερούν οι κορυφές του διαλύτη συγκριτικά με τις κορυφές της χιτοζάνης (στο Παράρτημα II φάσμα φιλμ χιτοζάνη χωρίς ενίσχυση). Η προσθήκη διαφορετικών περιεκτικότητας πλαστικοποιητή

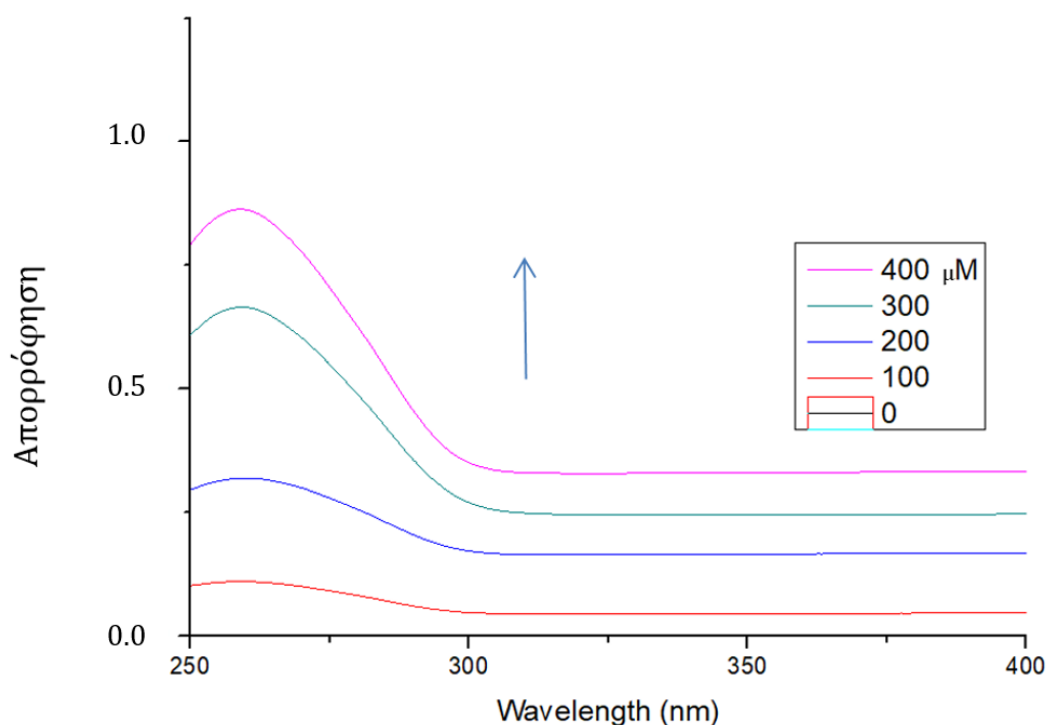
φαίνεται να μη δημιουργεί μία σταθερή τάση όσον αφορά στην αποτύπωση των κορυφών των φιλμ. Παρατηρείται επίσης, πως η προσθήκη εκχυλίσματος αντί για διαλύτη δίνει κορυφές μετατοπισμένες συγκριτικά με το φιλμ του διαλύτη. Αυτό υποδεικνύει πως στη μήτρα του φιλμ που σχηματίζει η χιτοζάνη, αναπτύσσονται αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στο διαλύτη και τις εκχυλισμένες ενώσεις. Ενώ το φάσμα του φιλμ που είναι ενισχυμένο με E/Bet:LA:W ομοιάζει με το φάσμα του εκχυλίσματος E/Bet:LA:W, δεν είναι πανομοιότυπα και υπάρχουν μετατοπίσεις και διαφορετικές αναλογίες εντάσεων των χαρακτηριστικών κορυφών. Αυτό φανερώνει ότι μπορεί πλέον στο φιλμ να έχουν αναπτυχθεί διαφορετικές αλληλεπιδράσεις από ότι στο εκχύλισμα.

3.2.5 Αλληλεπίδραση εκχυλίσματος E/Bet:LA:W με ct-DNA

Γενικά, το DNA αποτελεί τον πρωταρχικό ενδοκυτταρικό στόχο των αντικαρκινικών φαρμάκων. Αυτό συμβαίνει γιατί το DNA δύναται να αλληλεπιδράσει με μικρά μόρια αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό και την έκφραση του λανθασμένου γονιδιώματος των καρκινικών κυττάρων οδηγώντας τα σε κυτταρικό θάνατο. Η αλληλεπίδραση των ενώσεων με το DNA προκαλεί δομικές αλλαγές, οι οποίες ανιχνεύονται μέσω φασματοσκοπικών μεθόδων. Τα βότανα (φυτά) αποτελούν σημαντικές πηγές τέτοιων μορίων-προσδετών και η χρήση των εκχυλισμάτων κεντρίζει το ενδιαφέρον σε τέτοιες εφαρμογές.

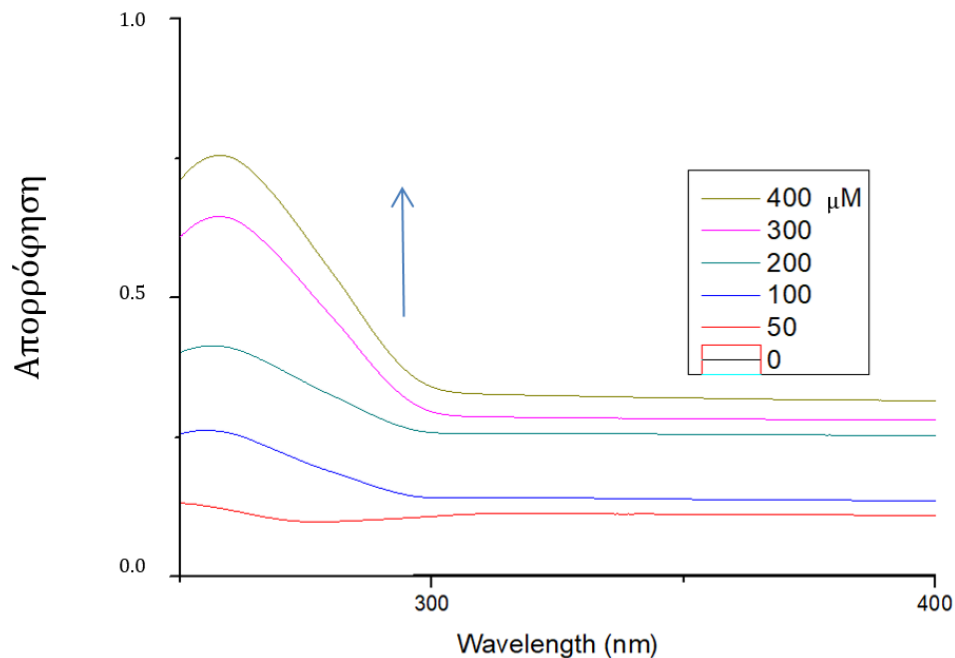
Το τζίντζερ αποτελεί αποθήκη πολλών σημαντικά αντιοξειδωτικών φαινολικών ουσιών. Περιέχει πληθώρα εν δυνάμει φαρμακευτικών ενώσεων που προσδίδουν τις θεραπευτικές του ιδιότητες. Οι ενώσεις αυτές με τη διαδικασία της εκχύλισης μεταφέρονται από το τζίντζερ στο εκχύλισμα. Συνεπώς, εάν ένα εκχύλισμα είναι πλούσιο σε μόρια-προσδέτες που αλληλεπιδρούν με το DNA τότε ανοίγει ένα νέο πεδίο μελέτης αναφορικά με τη χρήση εκχυλισμάτων ως αντικαρκινικοί παράγοντες. Χάρη στην ισχυρή αντιοξειδωτική του δράση, το εκχύλισμα E/Bet:LA:W επιλέχθηκε για τη μελέτη αλληλεπίδρασης με το ct-DNA.

Αρχικά μελετήθηκε η αλληλεπίδραση του Bet:LA (1:2) με το ct-DNA, ώστε να αποφανθεί εάν ο διαλύτης του εκχυλίσματος αλληλεπιδρά με τη διπλή έλικα και επηρεάζει τις μετρήσεις με το εκχύλισμα. Όπως αποτυπώνεται στο Διάγραμμα 1, ο βαθέως ευτηκτικός διαλύτης (Bet:LA (1:2)) παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος $\lambda_{\max}=259.2\text{nm}$. Με σταδιακή προσθήκη ct-DNA στο διάλυμά του με το διαλύτη, παρατηρείται αύξηση της έντασης απορρόφησης με παράλληλη μπλε (προς χαμηλότερα μήκη κύματος) μετατόπιση της μέγιστης απορρόφησης με $\lambda_{\max}=259.0\text{nm}$. Η αύξηση της έντασης απορρόφησης ονομάζεται υπερχρωμία που δηλώνει συναρμογή του διαλύτη στην εξωτερική αύλακα του DNA, ενώ η μπλε μετατόπιση ή υψιχρωμία δείχνει πρόσδεση στη μικρή αύλακα και αποσταθεροποίηση της ελικοειδούς δομής του DNA μέσω της αλληλεπίδρασης με το διαλύτη. Γενικά, η αλληλεπίδραση του βαθέως ευτηκτικού διαλύτη δε φαίνεται να είναι έντονη όσον αφορά τη σταθεροποίηση ή αποσταθεροποίηση του DNA.



Διάγραμμα 1. Φάσμα απορρόφησης του βαθέως εντηκτικού διαλύτη (Bet:LA (1:2)) σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl με αυξανόμενη συγκέντρωση ct-DNA (0-400μM). Το βέλος δείχνει την αύξηση έντασης απορρόφησης (υπερχρωμία).

Στη συνέχεια, μελετάται η αλληλεπίδραση του εκχυλίσματος E/Bet:LA:W με το ct-DNA. Ευρέθηκε, λοιπόν, όπως αποτυπώνεται στο Διάγραμμα 2, πως το εκχύλισμα του τζίντζερ (100μg/mL, pH = 7.4) παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος $\lambda_{\max}=254.8\text{nm}$, ενώ με τη σταδιακή προσθήκη ct-DNA παρατηρείται αύξηση στην ένταση απορρόφησης. Η υπερχρωμία αυτή δηλώνει ότι το εκχύλισμα αλληλεπιδρά με την εξωτερική επιφάνεια της διπλής έλικας. Επίσης, παρατηρείται ερυθρή μετατόπιση της μέγιστης απορρόφησης σε υψηλότερα μήκη κύματος, $\lambda_{\max}=257.8\text{nm}$. Η ερυθρή μετατόπιση σημαίνει πως το εκχύλισμα και ενδεχομένως, κυρίως οι εκχυλισμένες ενώσεις προσδένονται στην μεγάλη αύλακα του DNA σταθεροποιώντας το.

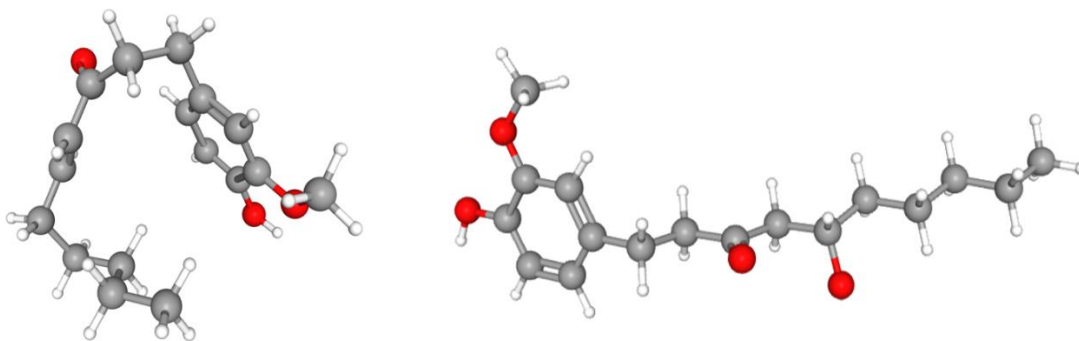


Διάγραμμα 2. Φάσμα απορρόφησης του εκχυλίσματος E/Bet:LA:W (0.1μg/mL) σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (pH=7.4) με αυξανόμενη συγκέντρωση ct-DNA (0-400μM) με χρόνο επώασης 5 λεπτά στους 37°C. Το βέλος δείχνει την αύξηση έντασης απορρόφησης (υπερχρωμία).

Συνεπώς, ο Bet:LA φαίνεται να αλληλεπιδρά εξωτερικά με την έλικα του DNA, ενώ δεν παρατηρείται σημαντική μετατόπιση της κορυφής που θα υποδήλωνε ισχυρή πρόσδεση στη μικρή αύλακα του DNA. Άρα, ο Bet:LA φαίνεται να μην αλληλεπιδρά ισχυρά με το DNA. Από την άλλη, το εκχύλισμα φαίνεται να αλληλεπιδρά και αυτό εξωτερικά με τη διπλή έλικα του DNA με συναρμογή στη μεγάλη αύλακά του, που αποτυπώνεται λόγω της ερυθρής μετατόπισης του μήκους κύματος της μέγιστης απορρόφησης. Χρησιμοποιώντας τη γραφική παράσταση Benesi-Hildebrand, υπολογίζεται η σταθερά πρόσδεσης του εκχυλίσματος με το DNA ίση με $K_b=2.0 \cdot 10^3 M^{-1}$.

Η διαφορά του εκχυλίσματος με το Bet:LA είναι πως στο εκχύλισμα περιέχονται και ενώσεις του τζίντζερ που μπορούν να προσδεθούν ισχυρά στην έλικα του DNA. Μάλλον η ερυθρή μετατόπιση που παρατηρείται για το εκχύλισμα οφείλεται στις ενώσεις του εκχυλίσματος του τζίντζερ που αλληλεπιδρούν διαφορετικά με το DNA σε σχέση με το διαλύτη. Όπως έχει ειπωθεί στη βιβλιογραφία, η 6-τζιντζερόλη έχει βρεθεί να προσδένεται στη μικρή αύλακα, άρα παρουσιάζει μπλε υπέρχρωμη μετατόπιση. Αντιθέτως, εδώ έχει βρεθεί πως το εκχύλισμα παρουσιάζει ερυθρή μετατόπιση. Αυτό είναι πιθανό να συμβαίνει γιατί το εκχύλισμα περιέχει πληθώρα διαφορετικών ενώσεων και όχι μόνο 6-τζιντζερόλη και η εκάστοτε ένωση αλληλεπιδρά διαφορετικά με το DNA. Επίσης, το εκχύλισμα προέρχεται από ξηρό θερμικά επεξεργασμένο τζίντζερ. Όπως έχει τονιστεί στη θεωρία, το ξηρό τζίντζερ περιέχει κυρίως

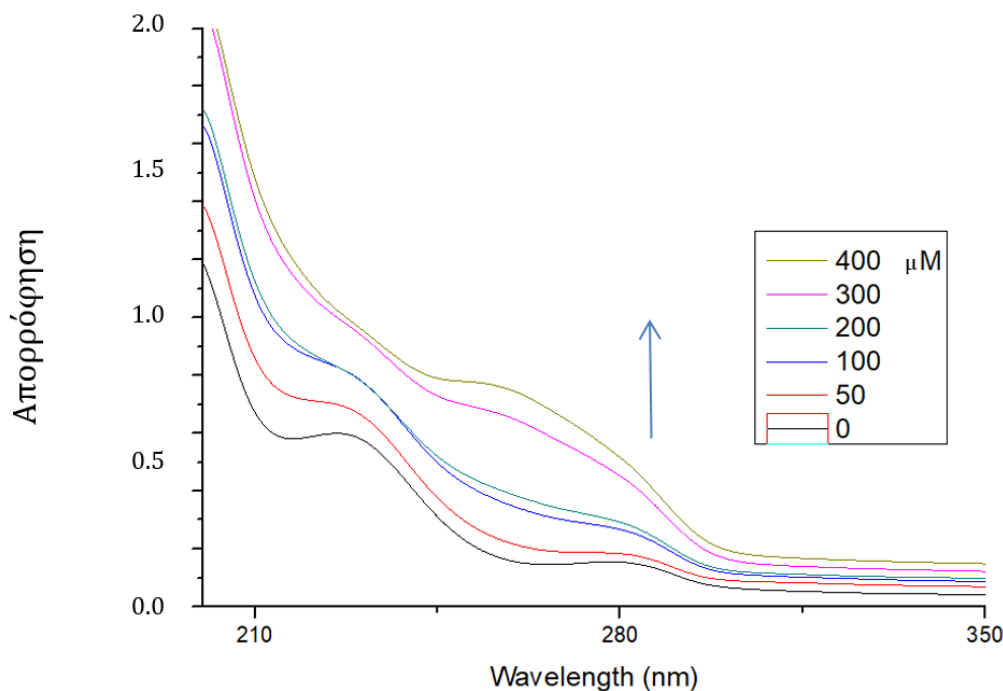
σογκαόλες και όχι τζιντζερόλες, λόγω της θερμικής επεξεργασίας και αφυδάτωσης των τζιντζερολών και της μακράς αποθήκευσης. Συνεπώς, το εκχύλισμα αναμένεται να είναι περισσότερο πλούσιο σε σογκαόλες, με κυριότερη την 6-σογκαόλη. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η πρόσδεση στη μικρή ή μεγάλη αύλακα επηρεάζεται από το μέγεθος και το σχήμα της ένωσης-προσδέτη και πως οι προσδέτες της μεγάλης αύλακας συνήθως έχουν τοξωτό σχήμα και επίπεδο μη συντηγμένο αρωματικό δακτύλιο.^[52] Όπως φαίνεται και στο ακόλουθο σχήμα η 6-τζιντζερόλη με την 6-σογκαόλη έχουν διαφορετικές δομές στο χώρο. Συνεπώς, θα μπορούσε η μία να προσδένεται στη μικρή και η άλλη στη μεγάλη αύλακα.



Σχήμα 14. Συγκριτικές τρισδιάστατες δομές της 6-σογκαόλης (αριστερά) και της 6-τζιντζερόλης (δεξιά).^[51]

Η αλληλεπίδραση, λοιπόν, του εκχυλίσματος καθορίζεται από τις ενώσεις που περιέχει. Η μελέτη αυτή είναι προκαταρκτική και σίγουρα απαιτείται εξακρίβωση των ενώσεων του εκχυλίσματος στη συνέχεια.

Θεωρητικά το φαινολικό φορτίο του εκχυλίσματος είναι κυρίως τζιντζερόλες, σογκαόλες και παραδόλες. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, βάσει της βιβλιογραφίας αναμένεται το κύριο συστατικό να είναι η σογκαόλη. Επιλέχθηκε να μελετηθεί η αλληλεπίδραση της καθαρής 6-σογκαόλης με το ct-DNA. Η περιεκτικότητα των διαλυμάτων που αναλύονται είναι 10μg/mL (pH = 7.4) σε 6-σογκαόλη. Επιλέχθηκε χαμηλότερη περιεκτικότητα από το εκχύλισμα, καθώς το εκχύλισμα αν και είναι πλούσιο σε φαινολικά, περιέχει κατά βάση διαλύτη. Οπότε επιλέγεται χαμηλότερη περιεκτικότητα σε 6-σογκαόλη, ώστε οι μετρήσεις να είναι στο επιθυμητό εύρος απορροφήσεων. Το διάλυμα της 6-σογκαόλης δίνει μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος $\lambda_{\max}=225.4\text{nm}$. Με σταδιακή προσθήκη ct-DNA το διάλυμα της 6-σογκαόλης εμφανίζει αύξηση στην ένταση της απορρόφησης ειδικά στο μήκος κύματος που αποτυπώνεται το σύμπλοκο DNA-προσδέτη (περίπου στα 260nm). Η υπερχρωμία αυτή συνοδεύεται με μετατόπιση προς μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης $\lambda_{\max}=260.0\text{nm}$, δηλαδή ερυθρή μετατόπιση που μεταφράζεται σε συναρμογή στη μεγάλη εξωτερική αύλακα του DNA. Η σταθερά πρόσδεσης της 6-σογκαόλης στο ct-DNA προσδιορίστηκε ίση με $K_b=3.8 \cdot 10^3\text{M}^{-1}$. Το εύρημα της ερυθρής μετατόπισης της 6-σογκαόλης έρχεται σε συμφωνία με την υπόθεση και τα ευρήματα που ελήφθησαν από το εκχύλισμα.



Διάγραμμα 3. Φάσμα απορρόφησης της σογκαόλης (0.01 μg/mL) σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (pH=7.4) με αυξανόμενη συγκέντρωση ct-DNA (0-400 μM) με χρόνο επώασης 5 λεπτά στους 37°C. Το βέλος δείχνει την αύξηση έντασης απορρόφησης (υπερχρωμία), ενώ αποτυπώνεται και η ερυθρή μετατόπιση.

Πίνακας 28. Αποτελέσματα αλληλεπίδρασης με το DNA

Μελετούμενη ουσία	λ_{\max} (nm) Διάλυμα χωρίς ct-DNA	λ_{\max} (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Υπερχρωμία (%)	K_b (M ⁻¹)
Bet:LA (1:2)	259.2	259	0.2	88.72	-
E/Bet:LA:W	254.8	257.8	3.0	69.10	2.0×10^3
Σογκαόλη	225.4	260	34.6	36.57	3.8×10^3

Αυτό που πρέπει να σημειωθεί είναι πως οι ενώσεις που εκχυλίζονται εμφανίζουν απορρόφηση στο μήκος κύματος 230nm και 280nm, ενώ και οι σογκαόλες εμφανίζουν μέγιστη απορρόφηση στα 230nm.^[110] Δεδομένου ότι και το σύμπλοκο εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 260nm είναι δύσκολη η μελέτη ενός τέτοιου συστήματος, καθώς δε θα προκύπτουν πολύ μεγάλες μετατοπίσεις.

3.3 Μελέτη διαλυτότητας κουρκουμίνης στο CAGE (1:2)

Η κουρκουμίνη είναι μία πολύ ισχυρή αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδης, ιστοπροστατευτική και αντικαρκινική ένωση. Οι ποικίλες ιδιότητές της, όπως έχουν αναπτυχθεί στο Θεωρητικό Μέρος, την κατατάσσουν ως ένα πολύ ισχυρό φάρμακο για διάφορες ασθένειες με τη χρήση της σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων. Η αξιοποίησή της, δε, παρουσιάζει αρκετά εμπόδια λόγω της χαμηλής βιοδιαθεσιμότητάς της. Το μεγαλύτερο εμπόδιο είναι πως είναι πρακτικά αδιάλυτη στο νερό. Γίνονται πλέον προσπάθειες εύρεσης νέων ουσιών που να μπορούν να διαλύσουν σε υψηλές συγκεντρώσεις την κουρκουμίνη, καθώς και η δημιουργία φορέων που να αυξάνουν τη βιοδιαθεσιμότητά της στο νερό.

Προς αυτή την κατεύθυνση στοχεύει το συγκεκριμένο κομμάτι της εργασίας. Χρησιμοποιείται το CAGE (1:2) ως ένας νέος διαλύτης με ισχυρή αντιμικροβιακή δράση για τη διάλυση της κουρκουμίνης για πρώτη φορά.

Αρχικά, μελετάται η ικανότητα διάλυσης της κουρκουμίνης σε διαλύτη CAGE (1:2) και δημιουργείται η αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς. Στη συνέχεια, μελετάται η επίδραση της συγκέντρωσης CAGE (1:2) σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH=7.4 στην αύξηση της διαλυτότητας της κουρκουμίνης στο ρυθμιστικό διάλυμα. Επίσης, το CAGE 1:2 έχει πολλές βιβλιογραφικές αναφορές ως κατάλληλος διαδερμικός μεταφορέας φαρμάκων. Στην εργασία αυτή αξιοποιείται η ικανότητα του CAGE (1:2) να σχηματίζει μικκύλια σε υδατικό μέσο, με σκοπό τον εγκλεισμό της κουρκουμίνης και τη μελέτη ενός πιθανού συστήματος μεταφοράς της κουρκουμίνης.

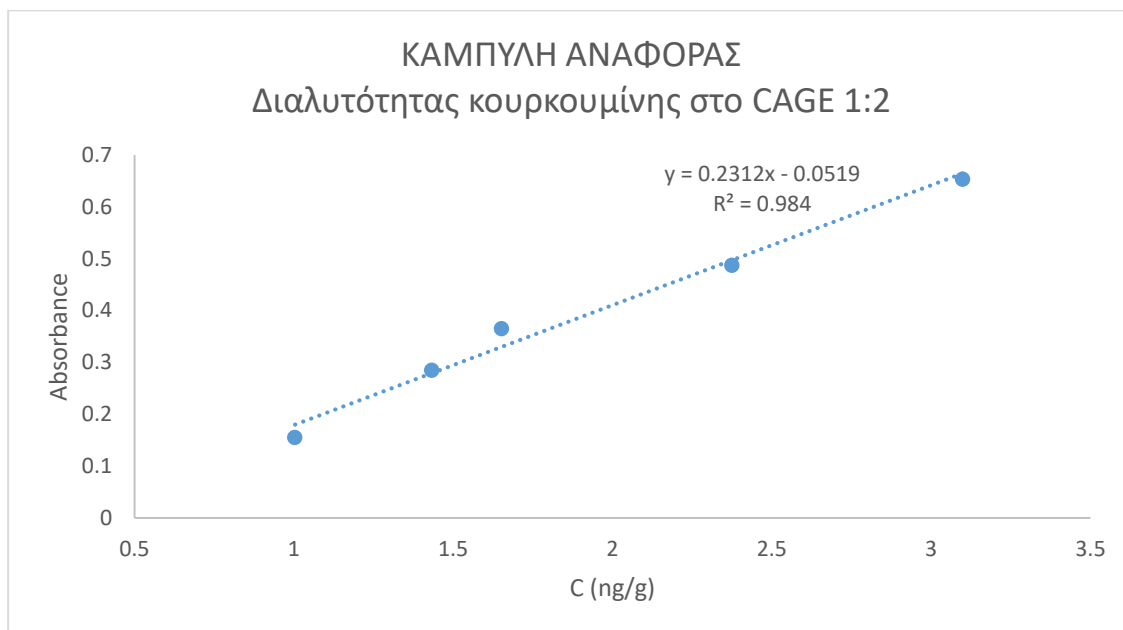
3.3.1 Διαλυτότητα και Καμπύλη Αναφοράς

Είναι γνωστό πως η κουρκουμίνη είναι αδιάλυτη στο νερό. Ο ανθρώπινος οργανισμός, όμως, αποτελείται κατά βάση από νερό και εάν η κουρκουμίνη δεν μπορεί να διαλυθεί σε αυτό, τότε ο ανθρώπινος οργανισμός αδυνατεί να την αξιοποιήσει και μαζί τις ισχυρές θεραπευτικές της ιδιότητες. Έχουν γίνει προσπάθειες χρήσης DESs ως διαλύτες της κουρκουμίνης, όπως περιγράφεται στο Θεωρητικό Μέρος της εργασίας. Μάλιστα η διαλυτότητα του καλύτερου εξ' αυτών βρέθηκε ίση περίπου με $8\text{mg}_{\text{cur}}/\text{g}_{\text{DES}}$. Η διαλυτότητα αυτή θεωρείται υψηλή εάν συγκριθεί με την αντίστοιχη στο νερό (0.0006mg/g).

Κατά την τέλεση των πειραμάτων για τη δημιουργία καμπύλης διαλυτότητας της κουρκουμίνης στο CAGE (1:2) αποδείχθηκε πως το CAGE (1:2) είναι πάρα πολύ καλός διαλύτης. Με σιγουριά μπορεί να ειπωθεί πως μπορούν να διαλυθούν τουλάχιστον 30mg κουρκουμίνης ανά g CAGE (1:2). Αυτό σημαίνει πως το CAGE (1:2) ίσως είναι ένας από τους καλύτερους διαλύτες της κουρκουμίνης που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία.

Κατά τη δημιουργία της καμπύλης αναφοράς, το διάλυμα που περιείχε 31mg κουρκουμίνης ανά g CAGE (1:2) είναι ένα βαθύ κόκκινο διαυγές υγρό. Έγιναν και προσπάθειες διάλυσης μεγαλύτερης ποσότητας κουρκουμίνης και φάνηκε πως η διαλυτότητά μπορεί να φτάσει ακόμα και τα 40mg/g σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Σαφώς απαιτείται περαιτέρω σχετική μελέτη.

Το κομμάτι αυτό περιορίζεται στη δημιουργία της καμπύλης αναφοράς για τα δείγματα CAGE (1:2) με διαλυμένη κουρκουμίνη. Η κουρκουμίνη δίνει μέγιστη απορρόφηση για μήκος κύματος 430nm και βάσει αυτού δημιουργείται η κάτωθι καμπύλη αναφοράς.



Διάγραμμα 4. Γραφική αναπαράσταση των συγκεντρώσεων κουρκουμίνης του CAGE (1:2) και της αποκρινόμενης απορρόφησης στο υπεριώδες-ορατό. Καμπύλη αναφοράς διαλυτότητας κουρκουμίνη σε CAGE (1:2).

Από τα δείγματα που μελετήθηκαν προκύπτει η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς να είναι:

$$y = 0.2312 * x - 0.0519, R^2 = 0.984$$

Όπου y η απορρόφηση και x η συγκέντρωση σε ng/g της κουρκουμίνης σε διαλύτη CAGE (1:2).

Δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην πειραματική μελέτη της διάλυσης της κουρκουμίνης, καθώς είναι ιδιαίτερα χρωστική σαν ένωση και επειδή το CAGE (1:2) έχει πολύ υψηλή διαλυτική ικανότητα σε κουρκουμίνη απαιτούνται διαδοχικές αραιώσεις που ενδεχομένως να αυξάνουν το σφάλμα των μετρήσεων. Γι' αυτό ο χειριστής είναι ιδιαίτερα προσεκτικός και οι μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο επαναλαμβάνονται αρκετές φορές.

Όσον αφορά τη διαλυτική ικανότητα του CAGE (1:2) σε κουρκουμίνη αυτή είναι τουλάχιστον 31mg/g. Έγινε προσπάθεια για μέτρηση υπέρκορων δειγμάτων με σκοπό τον προσδιορισμό της μέγιστης οριακής διαλυτότητας, αλλά τα αποτελέσματα εμφάνιζαν μη αμελητέες αποκλίσεις σε κάθε μέτρηση λόγω των διαδοχικών αραιώσεων που απαιτούνται για τόσο υψηλές συγκεντρώσεις κουρκουμίνης. Αυτό συμβαίνει καθώς μια μικρή απόκλιση στη μετρούμενη απορρόφηση μπορεί να είναι πολύ μεγάλη απόκλιση στην προσδιοριζόμενη διαλυτότητα του αρχικού δείγματος λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων. Παρατηρήθηκε, επίσης, πως η σταδιακή προσθήκη της κουρκουμίνης στο CAGE (1:2) σε υψηλές συγκεντρώσεις βοηθάει στην καλύτερη διάλυσή της από την εφάπαξ προσθήκη όλης της ποσότητας της κουρκουμίνης. Η μελέτη της μέγιστης διαλυτότητας CAGE (1:2) σε κουρκουμίνη συνεχίζεται στο εργαστήριο, όμως δε θα αναπτυχθεί περαιτέρω στην εργασία.

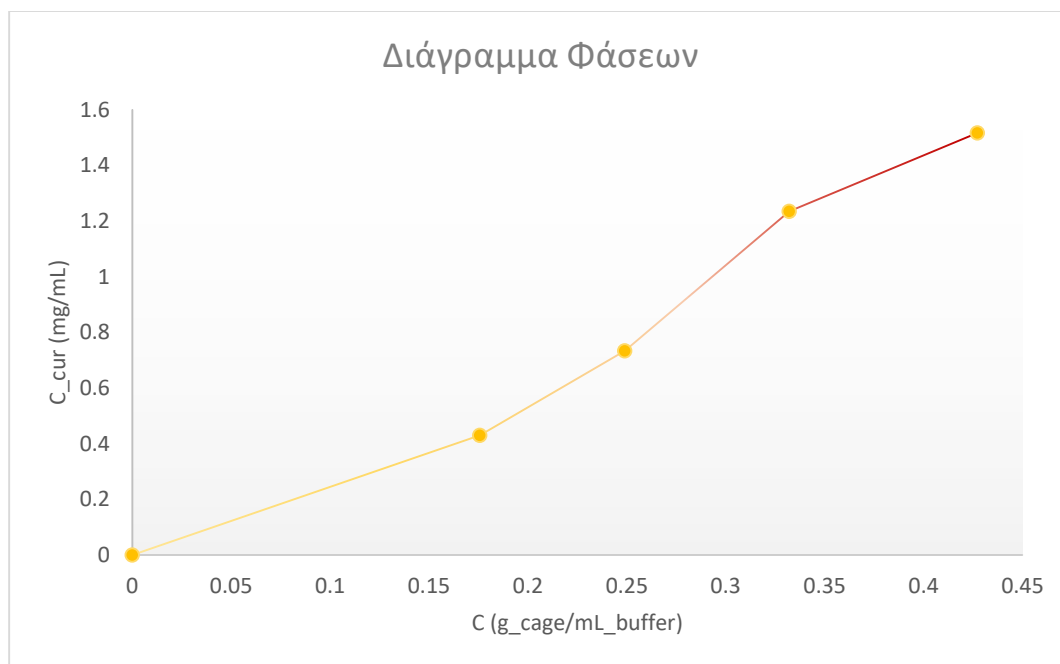
Συμπερασματικά, αποδεικνύεται για πρώτη φορά πως το CAGE (1:2) έχει υψηλή διαλυτική ικανότητα κουρκουμίνης και μάλιστα είναι τουλάχιστον 50000 φορές υψηλότερη συγκριτικά με το νερό. Το νερό, άλλωστε έχει διαλυτότητα κουρκουμίνης σε νανοκλίμακα, ενώ το CAGE (1:2) σε κλίμακα mg/mL.

Σχόλιο: Μετά την πάροδο αρκετών ημερών τα δείγματα επαναμετρήθηκαν δίνοντας επαναληψιμες μετρήσεις με τις αρχικές, κάτι που ενδεχομένως φανερώνει σταθερότητα της διαλυμένης σε CAGE (1:2) κουρκουμίνης. Θα είναι πολύ ενδιαφέρουσα μία μελέτη της σταθερότητας της κουρκουμίνης σε CAGE (1:2) υπό την επίδραση ηλιακής ακτινοβολίας, μιας και η κουρκουμίνη είναι ευοξειδωτη υπό συνθήκες έντονου φωτός.

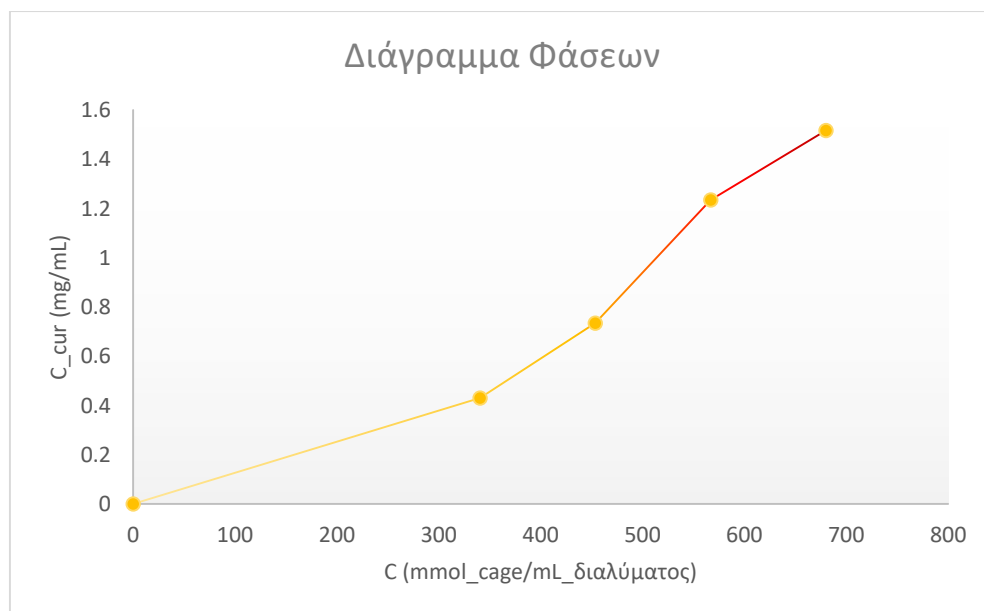
3.3.2 Μελέτη διαγράμματος φάσεων

Όπως έχει σημειωθεί, η αδυναμία διαλυτοποίησης της κουρκουμίνης σε νερό την καθιστά μη απορροφήσιμη από ανθρώπινο οργανισμό που αποτελείται κατά βάση από νερό. Επίσης, η διαλυτοποίησή της σε συμβατικούς οργανικούς διαλύτες δε δίνει λύση στο πρόβλημα βιοδιαθεσιμότητά της, καθώς δεν είναι δυνατή η χρήση τους σε βιοϊατρικές εφαρμογές.

Στην ενότητα αυτή, μελετάται κατά πόσο η ύπαρξη CAGE (1:2) μπορεί να αυξήσει την ικανότητα διαλυτοποίησης της κουρκουμίνης σε υδατικό μέσο με pH=7.4 και μετά διήμερης επώασης στους 37°C. Ουσιαστικά, μελετάται αν η χορήγηση της κουρκουμίνης μαζί με CAGE (1:2) μπορεί να αυξήσει τη διαλυτότητά της σε μέσο που ομοιάζει τις συνθήκες του ανθρώπινου οργανισμού και κατά συνέπεια, να την καταστήσει βιοδιαθέσιμη στον άνθρωπο.

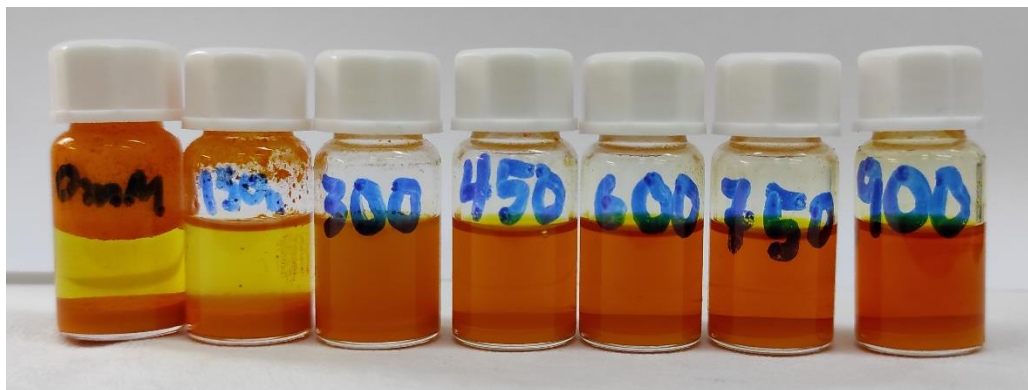


Διάγραμμα 5. Διάγραμμα διαλυτότητας σε mg/mL της κουρκουμίνης σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα με pH=7.4 για διαφορετικές περιεκτικότητες CAGE (1:2) σε $g_{CAGE}/mL_{\text{ρυθμιστικού διαλύματος}}$ μετά από διήμερη επώαση στους 37°C.



Διάγραμμα 6. Διάγραμμα διαλυτότητας σε mg/mL της κουρκουμίνης σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα με pH=7.4 για διαφορετικές συγκεντρώσεις CAGE (1:2) σε $mmol_{CAGE}/mL_{\text{συνολικού διαλύματος}}$ μετά από διήμερη επώαση στους 37°C.

Στα διαγράμματα φάσεων αποτυπώνεται ξεκάθαρα πως η ύπαρξη CAGE 1:2 σε υδατικό μέσο αυξάνει τη διαλυτότητα του υδατικού μέσου σε κουρκουμίνη. Μάλιστα όσο μεγαλύτερη η συγκέντρωση του CAGE 1:2 στο υδατικό μέσο τόσο περισσότερο αυξάνεται η διαλυτότητα κουρκουμίνης στο υδατικό μέσο.



Εικόνα 23. Υπέρκορα σε κουρκουμίνη υδατικά διαλύματα CAGE (1:2). Από αριστερά προς τα δεξιά: 0, 150, 300, 450, 600, 750, 900 $\frac{\text{mmol}_{\text{CAGE}1:2}}{\text{mL}_{\text{ρυθμιστικού διαλύματος}}}$. Η αύξηση της διαλυτότητας για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις CAGE(1:2) αποτυπώνεται οπτικά με βαθύτερο πορτοκαλί χρώμα.

Τα αποτελέσματα αποτυπώνονται και οπτικά. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του υδατικού μέσου σε CAGE (1:2), τόσο αυξάνεται η υδατοδιαλυτότητα της κουρκουμίνης δίνοντας ένα πιο έντονα πορτοκαλί χρώμα στο υπερκείμενο υγρό.

Να σημειωθεί σε αυτό το σημείο πως στο υδατικό μέσο υπάρχουν σωματίδια CAGE (1:2) με κουρκουμίνη, καθώς το CAGE (1:2) έχει την ικανότητα σχηματισμού μικκυλίων σε υδατικό μέσο, κάτι που δεν επηρεάζει τη μέθοδο που εφαρμόζεται. Η θολότητα που μπορεί να παρατηρηθεί σε ορισμένα δείγματα ενδεχομένως οφείλεται στη δημιουργία φάσης λαμέλων, ανάλογα με τη συγκέντρωση του μέσου σε CAGE (1:2), με την παράλληλη έλλειψη διαύγειας όπως έχει αναπτυχθεί στο Θεωρητικό Μέρος.

Συμπέρασμα Διαδικασίας

Γενικά, για να μπορεί να αξιοποιηθεί η κουρκουμίνη για βιολογική χρήση πρέπει η συγκέντρωσή της σε υδατικό μέσο να είναι της τάξης των μM , ενώ στην πραγματικότητα η ελεύθερη κουρκουμίνη βρίσκεται σε συγκέντρωση της τάξης των nM στο νερό. Από τις μετρήσεις φαίνεται πως η κουρκουμίνη είναι αρχικά αδιάλυτη σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα με $\text{pH}=7.4$ και επώαση δύο ημερών στους 37°C , δηλαδή σε συνθήκες που προσομοιάζουν του ανθρώπινου οργανισμού. Αυτό αποδεικνύει για ακόμη μία φορά πως η κουρκουμίνη είναι μη βιοδιαθέσιμη και ο ανθρώπινος οργανισμός δε δύναται να αξιοποιήσει τις ευεργετικές της ιδιότητες. Παρόλα αυτά, με την προσθήκη CAGE (1:2) η υδατοδιαλυτότητα της κουρκουμίνης αυξάνεται και μάλιστα φτάνει τα $1.52 \frac{\text{mg}_{\text{κουρκουμίνης}}}{\text{mL}_{\text{ρυθμιστικού δ/τος}}}$, όταν η περιεκτικότητα σε

CAGE (1:2) είναι $0.43 \frac{\text{g}_{\text{CAGE}}}{\text{mL}_{\text{ρυθμιστικού δ/τος}}}$. Η υδατοδιαλυτότητά της, δηλαδή, μπορεί να αυξηθεί

κατά τουλάχιστον 2500 φορές για τη συγκεκριμένη περιεκτικότητα CAGE (1:2). Η περιεκτικότητα αυτή αντιστοιχεί περίπου σε συγκέντρωση $4.1\mu\text{M}$ της κουρκουμίνης στο υδατικό μέσο. Αυτό σημαίνει ότι η κουρκουμίνη βρίσκεται σε συγκέντρωση της επιθυμητής, πλέον, τάξης μεγέθους και μπορεί να αξιοποιηθεί για βιολογική δραστηριότητα από τον οργανισμό.

Αποδεικνύεται, λοιπόν, ότι το CAGE (1:2) είναι ικανό να αυξήσει την υδατοδιαλυτότητα και κατά συνέπεια, τη βιοδιαθεσιμότητα της κουρκουμίνης σε ενδεχόμενη χρήση στον ανθρώπινο οργανισμό. Αυτό το εύρημα είναι πολύ σημαντικό, καθώς καθιστά την κουρκουμίνη δυνητικά βιοδιαθέσιμη και τις φαρμακευτικές της ιδιότητες αξιοποιήσιμες για την καταπολέμηση ασθενειών.

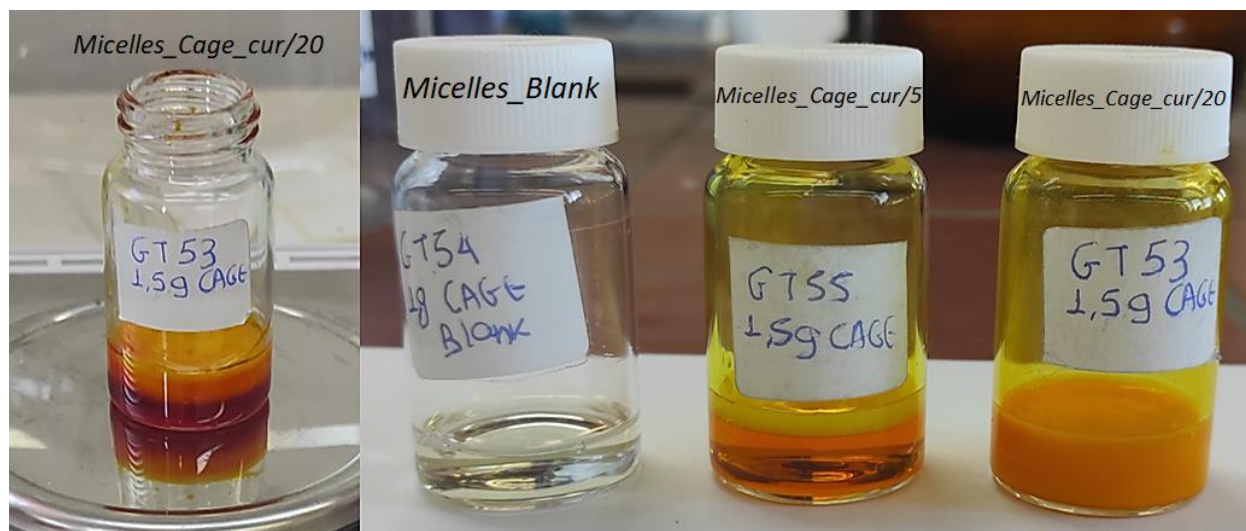
Το CAGE (1:2) σε χαμηλές συγκεντρώσεις δεν είναι τοξικό, αλλά είναι αντιμικροβιακό. Βέβαια σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι κυτταροτοξικό. Επομένως, είναι δυνατός ο συνδυασμός της κουρκουμίνης με το CAGE (1:2), ώστε να στοχεύουν συγκεκριμένα καρκινικά κύτταρα και να τα θανατώνουν με την υψηλή αντιοξειδωτική και αντικαρκινική τους δράση. Είναι εύλογη η περαιτέρω μελέτη ενός τέτοιου συστήματος παράδοσης φαρμάκου, καθώς τόσο η κουρκουμίνη που μπορεί να καταστεί πλέον βιοδιαθέσιμη όσο και το CAGE (1:2) εμφανίζουν υποσχόμενη φαρμακευτική δράση.

Η συγκεκριμένη εργασία είναι η πρώτη που αποδεικνύει την αύξηση της υδατοδιαλυτότητας της κουρκουμίνης με τη χρήση CAGE (1:2) με την παράλληλη αύξηση της βιοδιαθεσιμότητάς της.

3.4 Σχηματισμός μικκυλίων CAGE (1:2) και εγκλεισμός κουρκουμίνης εντός αυτών

Για τη μελέτη του εγκλεισμού της κουρκουμίνης σε νανοσωματίδια CAGE (1:2) επιλέχθηκαν δύο συγκεντρώσεις σε κουρκουμίνη, μία χαμηλότερη και μία υψηλότερη. Κατά την προσθήκη του υδατικού μέσου στο διάλυμα κουρκουμίνης-CAGE (1:2) εμφανίζεται αρχικά μία διφασική περιοχή μέχρι να ολοκληρωθεί η ανάμιξη. Στη συνέχεια, στα πρώτα στάδια της ανάδευσης το σύστημα έχει ένα θολό πορτοκαλί χρώμα, που ενδεχομένως οφείλεται στη θολότητα που προκαλείται από το CAGE (1:2) όταν σε αυτό προστίθεται νερό, στη δημιουργία αρχικά φάσης λαμέλων, στην κουρκουμίνη που εκείνη τη στιγμή αιωρείται αδιάλυτη στο νερό και δεν έχει προλάβει να εγκλειστεί. Ουσιαστικά, το σύστημα απαιτεί λίγο χρόνο μέχρι το CAGE (1:2) να δημιουργήσει τα μικκύλια και μέσα σε αυτά να εγκλειστεί η κουρκουμίνη. Μετά τη δημιουργία των μικκυλίων που έχουν εγκλείσει την κουρκουμίνη το διάλυμα αποκτά διαυγή μορφή. Ωστόσο, όταν η συγκέντρωση της προς εγκλεισμού κουρκουμίνης αυξάνεται, το τελικό σύστημα παραμένει έντονα πορτοκαλί και δεν αποκτά πάλι διαυγή όψη. Για αυτό μπορεί να ευθύνεται ο τρόπος διάταξης των ενώσεων σε τέτοιες συγκεντρώσεις.

Μετά τη λυοφιλοποίηση των δειγμάτων παραλαμβάνεται το υγρό πλέον δείγμα που είναι διαυγές σε κάθε περίπτωση. Το δείγμα δε στερεοποιείται καθώς το CAGE (1:2) δεν εξαχνώνεται μαζί με το νερό και έτσι παραμένει και αυτό στο δείγμα. Από τα δείγματα λαμβάνονται οι κατάλληλες μετρήσεις για τον υπολογισμό της απόδοσης εγκλεισμού και διεργασίας, όπως περιγράφεται στο Πειραματικό Μέρος, στην Ενότητα 2.4.4.



Εικόνα 24. Οπτική αναπαράσταση από αριστερά προς τα δεξιά: (1) Δείγμα *Micelles_Cage_cur/20* αμέσως μετά την προσθήκη νερού και πριν την έναρξη της ανάδευσης, (2) Τυφλό δείγμα *Micelles_Blank* μετά τη λυοφιλοποίηση, (3) Λυοφιλοποιημένο αραιό σε κουρκουμίνη δείγμα *Micelles_Cage_cur/5* και (4) Λυοφιλοποιημένο πυκνό σε κουρκουμίνη δείγμα *Micelles_Cage_cur/20*.

3.4.1 Απόδοση διεργασίας και εγκλεισμού

Στον πίνακα 29 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τις αποδόσεις εγκλεισμού και διεργασίας.

Πίνακας 29. Αποδόσεις εγκλεισμού και διεργασίας για τα δείγματα εγκλεισμού της κουρκουμίνης.

Κωδικός Εγκλεισμού	Απόδοση εγκλεισμού (%)	Απόδοση διεργασίας (%)
Micelles_Blank	-	94
Micelles_Cage_cur/5	84	95
Micelles_Cage_cur/20	88	99

Φαίνεται, λοιπόν, πως η απόδοση εγκλεισμού της κουρκουμίνης είναι ικανοποιητική, άνω του 80%, και η κουρκουμίνη προσδένεται αποτελεσματικά με τα σωματίδια. Μάλιστα για το δείγμα που περιείχε αρχικά τη μεγαλύτερη συγκέντρωση κουρκουμίνης (*Micelles_Cage_cur/20*) εμφανίζει ελαφρώς υψηλότερη απόδοση εγκλεισμού.

Να σημειωθεί σε αυτό το σημείο ότι έγιναν και μετρήσεις για τον υπολογισμό της μη εγκλεισμένης κουρκουμίνης με τη μεθοδολογία που περιγράφεται στο Πειραματικό Μέρος. Η μελέτη κατέδειξε ότι για κανένα από τα δείγματα δεν μπορούσε να ανιχνευτεί ποσότητα μη εγκλεισμένης κουρκουμίνης. Αυτό σημαίνει ότι η επιφανειακά προσροφημένη κουρκουμίνη είναι αμελητέα.

3.4.2 Μέγεθος σωματιδίων, Δείκτης Πολυδιασποράς και Ζ-δυναμικό

Στο Θεωρητικό Μέρος αναφέρεται πως σε υδατικό μέσο το CAGE (1:2) σχηματίζει μικκύλια σε νανοκλίμακα. Πλέον, μελετώνται τα χαρακτηριστικά της διασποράς των σωματιδίων CAGE (1:2) που περιέχουν εγκλεισμένη την κουρκουμίνη. Οι μετρήσεις για κάθε μέγεθος αφορούν στο τυφλό δείγμα, καθώς και στα δείγματα με χαμηλή και υψηλή αναλογία σε κουρκουμίνη. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα 30.

Πίνακας 30. Διάμετρος, δείκτης πολυδιασποράς και ζ-δυναμικό για τα δείγματα εγκλεισμού μέσω Δυναμικής Σκέδασης Φωτός.

Κωδικός Εγκλεισμού	Αρχική αναλογία ($\frac{mg_{\text{κουρκουμίνης}}}{g_{\text{CAGE1:2}}}$)	Μέση Υδροδυναμική Διάμετρος Σωματιδίων (nm)	Δείκτης Πολυδιασποράς (PDI)	ζ-Δυναμικό (nm)
Micelles_Blank	0	131.9±10.6	0.358±0.032	-33.0±0.26
Micelles_Cage_cur/5	5.45	146.9±4.5	0.359±0.011	-13.9±2.02
Micelles_Cage_cur/20	20.33	278.6±7.9	0.186±0.026	-27.0±1.21

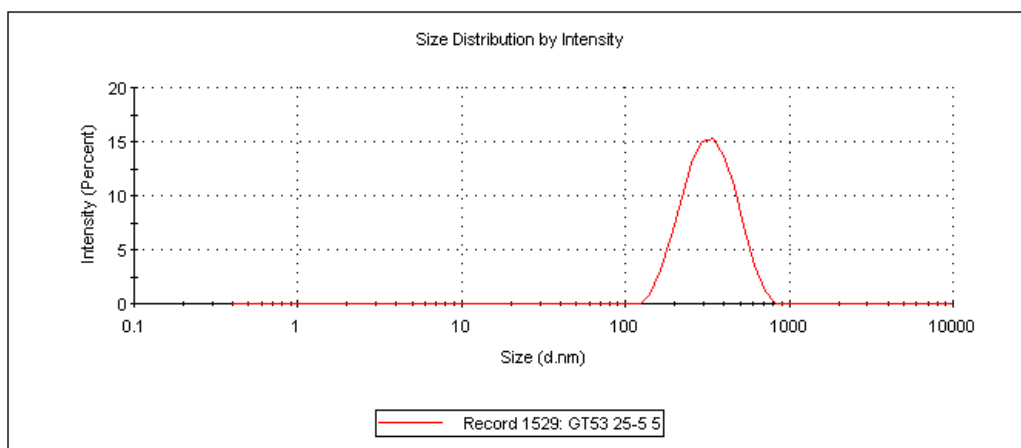
Πράγματι επιβεβαιώνεται ότι τα σωματίδια που σχηματίζονται αντιστοιχούν στη νανοκλίμακα. Μάλιστα το μέγεθος των σωματιδίων κυμαίνεται από 120nm έως 290nm -ανάλογα με την κουρκουμίνη που εγκλείεται- που είναι επιθυμητό για εφαρμογές εγκλεισμού σε νανοκλίμακα. Ο δείκτης πολυδιασποράς αποτελεί το μέτρο της ομοιομορφίας της διασποράς των σωματιδίων και στη μελετώμενη περίπτωση κυμαίνεται από 0.18 έως 0.36. Όταν ο δείκτης πολυδιασποράς είναι κάτω του 0.2, τότε η διασπορά των σωματιδίων εμφανίζει μια κατά Gauss κατανομή και δεν είναι ευρεία με «ομάδες» σωματιδίων διαφορετικών μεγεθών. Στην περίπτωση του CAGE (1:2) και της κουρκουμίνης, τα σωματίδια εμφανίζουν γενικά μη ευρεία κατανομή και φαίνεται πως τα σχηματιζόμενα σωματίδια φαίνεται να έχουν συναφή μεγέθη.

Όταν τα στερεά σωματίδια διασπείρονται σε ένα υγρό μέσο, τότε αποκτούν θετικό ή αρνητικό φορτίο ανάλογα με το φορτίο των ομάδων του σωματιδίου και των προσροφημένων ιόντων του μέσου διασποράς. Κάπως έτσι δημιουργείται το ζ-δυναμικό. Όσο μεγαλύτερη η κατ' απόλυτο τιμή του ζ-δυναμικού μιας διασποράς σωματιδίων, τόσο μεγαλύτερες είναι οι απώσεις που δημιουργούνται μεταξύ των σωματιδίων, με αποτέλεσμα να μειώνεται η τάση για συσσωμάτωση διατηρώντας την ομοιομορφία και το μέγεθος των σωματιδίων. Επομένως, το ζ-δυναμικό αποτελεί μέτρο της σταθερότητας του συστήματος σωματιδίων και μέσου διασποράς. Τιμές ζ-δυναμικού μεγαλύτερες από 30mV, κατά απόλυτη τιμή, δηλώνουν σταθερές διασπορές. Συνεπώς, οι διασπορές του CAGE (1:2) είναι γενικά σταθερές, ενώ διασπορές CAGE (1:2)-κουρκουμίνης είναι μέτρια σταθερές προς ικανοποιητικά σταθερές όσο αυξάνεται η αρχική αναλογία κουρκουμίνης.

Όσον αφορά στο τυφλό δείγμα αυτό περιέχει μόνο τον προς μελέτη φορέα, CAGE (1:2). Το μέγεθος των σωματιδίων είναι 131.9nm και ο δείκτης πολυδιασποράς ίσος με 0.358, που δηλώνει μέτρια προς καλή ομοιογένεια της κατανομής μεγέθους των σωματιδίων. Στην πραγματικότητα, το κυρίαρχο μέγεθος σωματιδίων είναι γύρω στα 130nm και εμφανίζονται κάποια σωματίδια μεγέθους >1μm. Το ζ-δυναμικό ισούται με -33mV και υποδηλώνει μια σταθερή διασπορά σωματιδίων.

Όσον αφορά στο δείγμα Micelles_Cage_cur/5, η αρχική αναλογία CAGE (1:2) προς κουρκουμίνη είναι 5.45mg/g. Το μέγεθος των σωματιδίων είναι 146.9nm και ο δείκτης πολυδιασποράς ίσος με 0.359, που δηλώνει μέτρια προς καλή ομοιογένεια της κατανομής μεγέθους των σωματιδίων. Παρατηρείται μια μικρή αύξηση μεγέθους σε σχέση με τα σωματίδια του τυφλού δείγματος. Αυτό συμβαίνει, γιατί η κουρκουμίνη έχει εγκλειστεί εντός των σωματιδίων CAGE (1:2) αυξάνοντας το μέγεθός τους. Η τιμή του ζ-δυναμικού είναι χαμηλότερη από των απλών σωματιδίων CAGE (1:2).

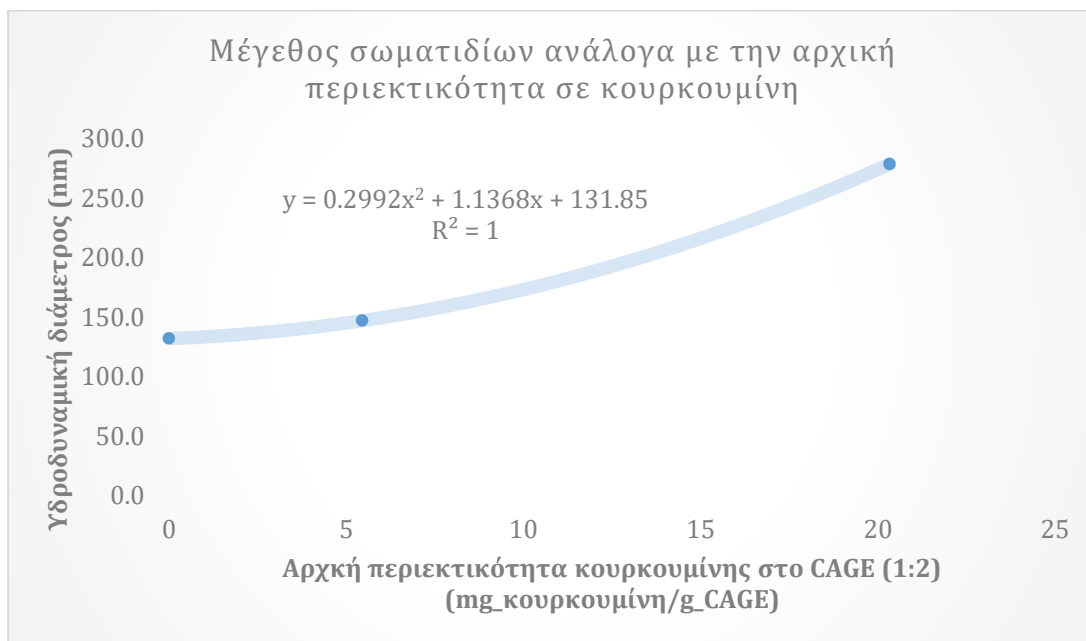
Όσον αφορά στο δείγμα Micelles_Cage_cur/20, η αρχική αναλογία CAGE (1:2) προς κουρκουμίνη είναι 20.33mg/g. Το μέγεθος των σωματιδίων είναι 278.6nm και ο δείκτης πολυδιασποράς ίσος με 0.186. Το μέγεθος των σωματιδίων έχει αυξηθεί αρκετά σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα και πιθανότατα αποτελεί μία ένδειξη ότι έχει εγκλειστεί υψηλό ποσοστό κουρκουμίνης. Εντύπωση προκαλεί η άριστη κατανομή μεγέθους των σωματιδίων. Ο δείκτης πολυδιασποράς είναι μικρότερος του 0.2, κάτι που υποδηλώνει ότι η διασπορά είναι ομοιογενής και το σύστημα μονοδιάσπαρτο. Η τιμή του ζ-δυναμικού (-27.0mV) είναι υψηλότερη (κατ' απόλυτη τιμή) του δείγματος Micelles_Cage_cur/5 που περιέχει λιγότερη κουρκουμίνη και ελάχιστα μικρότερη από του τυφλού. Από τα αποτελέσματα η διασπορά έχει ικανοποιητικό μέγεθος, πολύ καλή ομοιογένεια και τα σωματίδια είναι σταθερά και δεν έχουν τάση να συσσωματωθούν.



Γράφημα 12. Μία εκ των επιμέρους σαρώσεων DLS για το μέγεθος των σωματιδίων του δείγματος Micelles_Cage_cur/20. Φαίνεται πως τα σωματίδια εμφανίζουν μία άριστη ομοιομορφία.

Σε αυτό το σημείο να τονιστεί πως έχουν γίνει μετρήσεις μεγέθους, δείκτη πολυδιασποράς και ζ-δυναμικού για το CAGE (1:2), το οποίο δεν έχει υποστεί την επεξεργασία εγκλεισμού και λυοφιλοποίησης όπως το τυφλό δείγμα. Τα μεγέθη σωματιδίων που ανέκυψαν ήταν αρκετά μεγαλύτερα και σχετικά ασταθή, ενώ η διασπορά δεν ήταν ομοιογενείς. Αποφαινεται, λοιπόν, ότι η διαδικασία που ακολουθείται (λυοφιλοποίηση) επηρεάζει το μέγεθος των σχηματιζόμενων σωματιδίων, ενώ παράλληλα τα καθιστά σταθερότερα.

Συγκρινόμενα τα δείγματα μεταξύ τους, αύξηση στην αρχική αναλογία κουρκουμίνης προς εγκλεισμό προκαλεί αύξηση του μεγέθους των σωματιδίων, ενδεικτικό του επιτυχή εγκλεισμού. Επίσης, φαίνεται πως η διασπορά του πυκνού σε κουρκουμίνη δείγματος είναι απόλυτα ομοιογενής σε σχέση με το τυφλό και το αραιό δείγμα. Τέλος, αν και το πυκνό δείγμα αποφαίνεται ως σταθερότερο του αραιού, δεν προκύπτει μια σταθερή τάση ανάμεσα στην αρχική συγκέντρωση κουρκουμίνης των δειγμάτων και του ζ-δυναμικού για την εξαγωγή ασφαλούς συμπεράσματος της επιρροής της κουρκουμίνης στις αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα.



Διάγραμμα 7. Μεταβολή μεγέθους νανοσωματιδίων συναρτήσει της αρχικής περιεκτικότητας κουρκουμίνης του δείγματος,

Σε κάθε περίπτωση, ο εγκλεισμός της κουρκουμίνης σε νανοσωματίδια CAGE (1:2) συμπεραίνεται επιτυχής, με το σχηματισμό σταθερών και ομοιογενών διασπορών και ικανοποιητική απόδοση. Τα αποτελέσματα είναι πολλά υποσχόμενα για τη χρήση του CAGE (1:2) ως νανοφορέα της κουρκουμίνης σε φαρμακευτική χρήση για την καταπολέμηση σοβαρών ασθενειών.

Στα πλαίσια της εργασίας έγιναν μελέτες για τον προσδιορισμό του προφίλ απελευθέρωσης της κουρκουμίνης από τα νανοσωματίδια σε υδατικό μέσο και συνθήκες που ομοιάζουν του ανθρώπινου οργανισμού. Παρόλα αυτά, στη μελέτη του προφίλ απελευθέρωσης ανέκυψαν δυσκολίες σχετικά με την εφαρμογή της κατάλληλης μεθοδολογίας μελέτης. Αυτή την περίοδο οι μελέτες για τον προσδιορισμό της απελευθέρωσης συνεχίζονται και τα αποτελέσματα θα εκδοθούν σε συναφή ερευνητική δημοσίευση και δε θα παρουσιαστούν στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας.

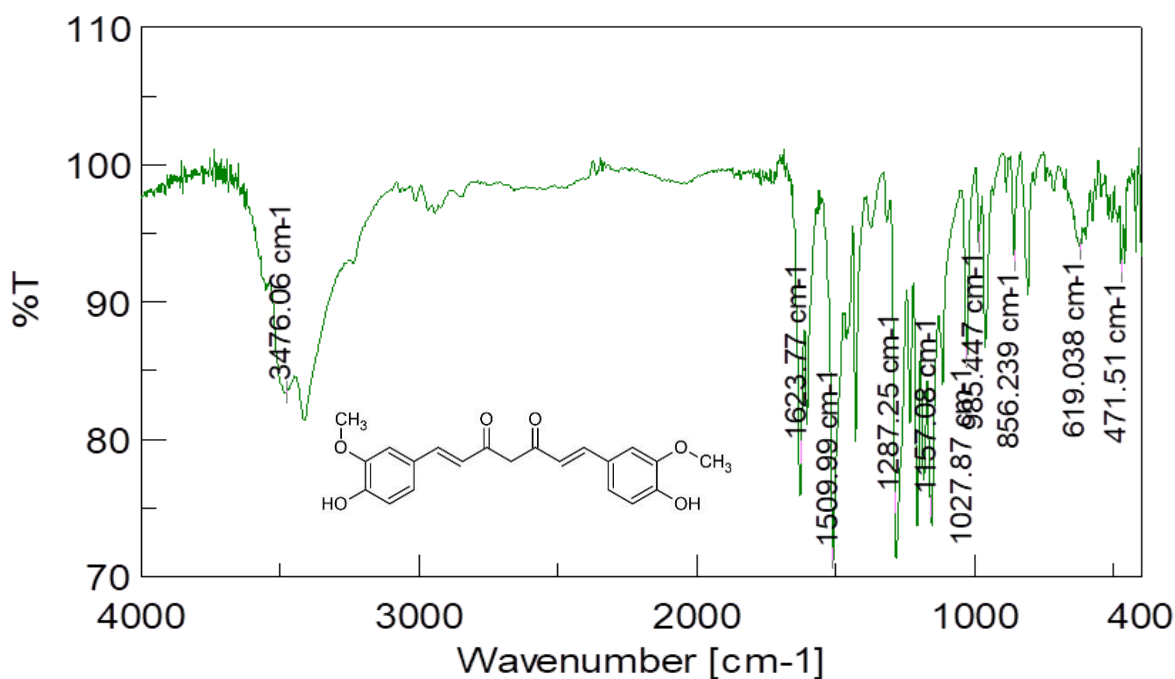
Υπενθυμίζεται πως το BAGE (1:3.5) αρχικά σχεδιάστηκε ως εναλλακτική του CAGE (1:2). Συνεπώς, έγινε μία προκαταρκτική μελέτη για τη δυνατότητά του να σχηματίζει μικκύλια σε υδατικό μέσο. Αυτό που παρατηρήθηκε είναι πως πράγματι σχηματίζονται μικκύλια σε υδατικό μέσο και έγινε χαρακτηρισμός τους μέσω DLS. Τα αποτελέσματα έδειξαν όταν προστίθεται ποσότητα BAGE (1:3.5) σε υπερκάθαρο νερό, σχηματίζονται σωματίδια μέσου μεγέθους $783.2 \pm 227.6 \text{ nm}$, με δείκτη πολυδιασποράς 0.546 ± 0.090 και ζ-δυναμικό $32.4 \pm 2.2 \text{ mV}$. Τα προκύπτοντα σωματίδια είναι μεγαλύτερου μεγέθους από τα σωματίδια του CAGE (1:2), είναι σταθερά, αλλά δεν εμφανίζουν ικανοποιητικά ομοιογενή διασπορά. Σημειώνεται πως και τα σωματίδια του CAGE (1:2) είχαν μεγαλύτερο μέγεθος πριν υποστούν τη διαδικασία του εγκλεισμού. Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι πιθανότατα σχηματίζονται μικκύλια BAGE (1:3.5) όταν βρίσκεται σε περίσσεια νερού. Τα ευρήματα είναι ενθαρρυντικά και προτείνεται να συνεχιστεί η έρευνα για την μελέτη των δυνατοτήτων του BAGE (1:3.5) ως διαλύτης και νανοφορέας.

3.4.3 Χαρακτηρισμός μέσω IR φασμάτων

Έχουν ληφθεί τα φάσματα FT-IR για την κουρκουμίνη και τα δείγματα *Micelles_Blank*, *Micelles_Cage_cur/5*, *Micelles_Cage_cur/20*. Ο στόχος είναι να μελετηθεί η αλληλεπίδραση που μπορεί να υπάρχει μεταξύ του φορέα (CAGE (1:2)) και της εγκλεισμένης ένωσης (κουρκουμίνη).

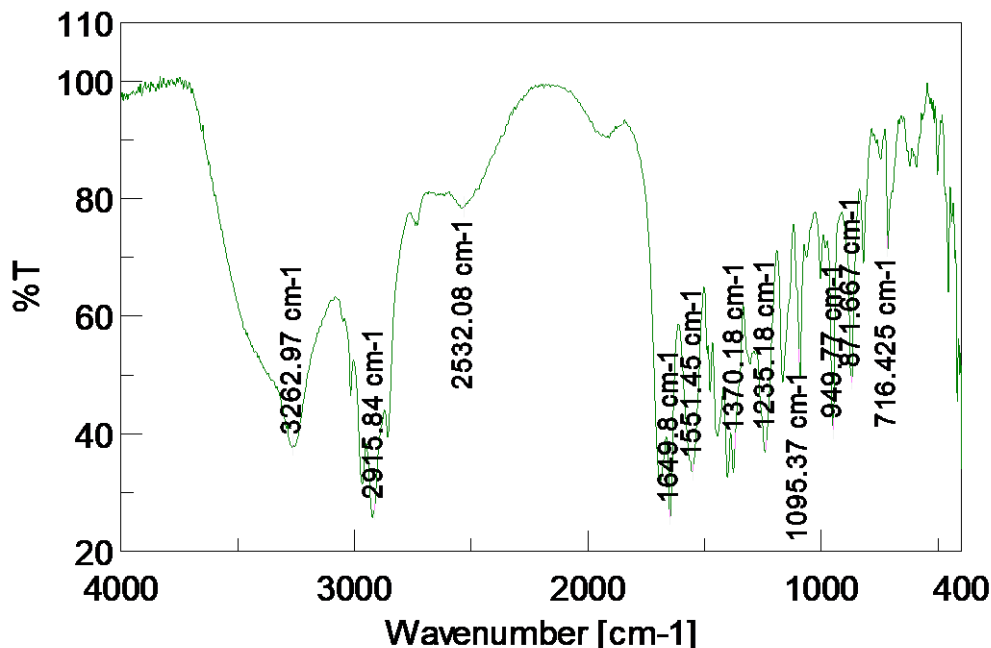
Αρχικά, στο φάσμα της κουρκουμίνης αποτυπώνεται μία ευρεία κορυφή στους κυματαριθμούς $3200\text{-}3500 \text{ cm}^{-1}$ με μέγιστη ένταση περίπου στα 3400 cm^{-1} και οφείλεται σε δόνηση τάσης των υδροξυλομάδων που συνδέονται στο δακτύλιο. Το φάσμα επίσης αποτυπώνει τις δονήσεις τάσης του δεσμού C=O των καρβονυλίων με κορυφή στα 1623.77 cm^{-1} . Υψηλής έντασης κορυφή εμφανίζεται στα 1509.99 cm^{-1} και αποδίδεται σε συνδυασμό δονήσεων: σε δονήσεις κάμψης των αλειφατικών δεσμών CC-C, CC=O, σε δονήσεις τάσης γύρω από τον αρωματικούς δεσμούς CC της κετο- και ενόλης διαμόρφωσης της κουρκουμίνης, σε δονήσεις κάμψης των αρωματικών CC-H των δύο διαμορφώσεων και τέλος, σε δονήσεις κάμψης των αλειφατικών δεσμών CC-C και CC=O.^{[111][112][113]} Ακόμα, στα 1287.25 cm^{-1} οι δονήσεις κάμψης των φαινολικών δεσμών C-O δίνουν σημαντικής έντασης κορυφή. Η κορυφή στα

1157.08cm^{-1} οφείλεται πιθανότητα σε δόνηση τάσης του δεσμού C-O του αλκυλ-αρυλαιθέρα στο μόριο της κουρκουμίνης.



Γράφημα 13. Φάσμα IR για την κουρκουμίνη.

Στη συνέχεια, παρατίθενται τα φάσματα IR των δειγμάτων Micelles_Blank, Micelles_Cage_cur/5 και Micelles_Cage_cur/20. Το δείγμα Micelles_Blank περιέχει μόνο τα σωματίδια του φορέα, ενώ τα Micelles_Cage_cur/5 και Micelles_Cage_cur/20 περιέχουν και εγκλεισμένη κουρκουμίνη. Συγκρινόμενα ίσως καταστήσουν δυνατή μία πρώτη ένδειξη για τις αλληλεπιδράσεις που μπορεί να λαμβάνουν χώρα μεταξύ CAGE (1:2) και εγκλεισμένης κουρκουμίνης.

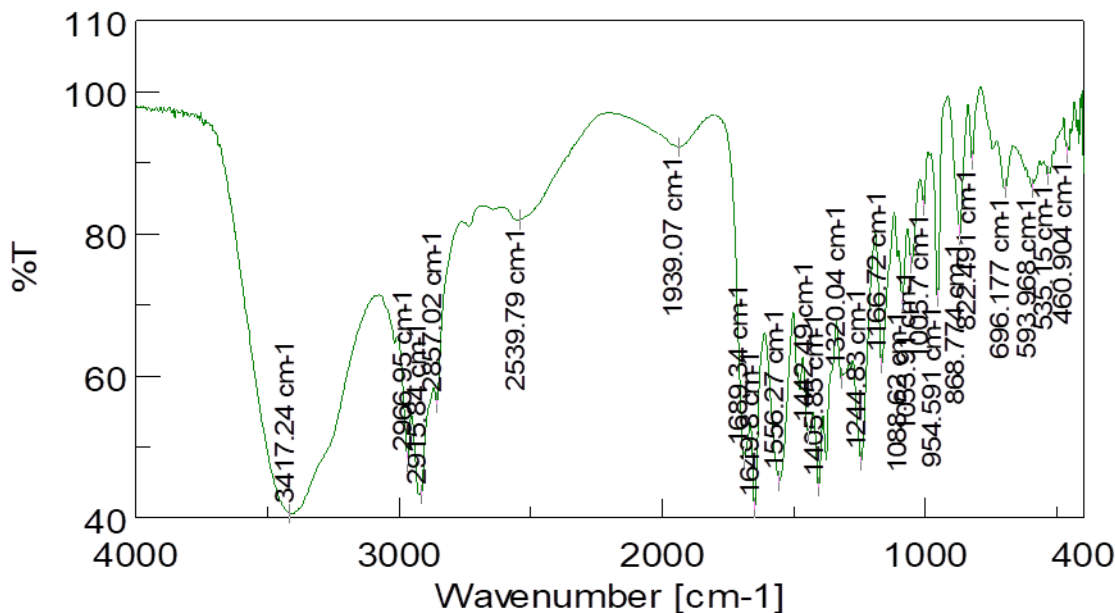


Γράφημα 14. Φάσμα IR για το Micelles_Blank που περιέχει μόνο το φορέα CAGE (1:2) .

Κατ' αρχάς, αν συγκριθεί το φάσμα του δείγματος Micelles_Blank, που περιέχει μόνο το φορέα CAGE (1:2), με το φάσμα του CAGE (1:2) που δεν έχει υποστεί επεξεργασία εγκλεισμού (Γράφημα 14) αποτυπώνονται οι ίδιες κορυφές των χαρακτηριστικών ομάδων και υπάρχουν ορισμένες αμελητέες μεταβολές στους κυματαριθμούς των μεγίστων των κορυφών. Επομένως, το δείγμα Micelles_Blank είναι ασφαλές να ειπωθεί πως δεν περιέχει προσμίξεις.

Παρακάτω δίνεται το φάσμα IR για το δείγμα Micelles_Cage_cur/5 που είναι αυτό που περιέχει κουρκουμίνη σε αρχική περιεκτικότητα $5.45 \text{mg}_{\text{κουρκουμίνη}}/\text{g}_{\text{CAGE(1:2)}}$. Το φάσμα εμφανίζει μία ευρεία κορυφή στο εύρος $3100\text{-}3550 \text{cm}^{-1}$ και πιθανότητα οφείλεται στο συνδυασμό της δόνησης τάσης τόσο των υδροξυλομάδων της χολίνης του CAGE (1:2) όσο και των υδροξυλομάδων των αρωματικών δακτυλίων της κουρκουμίνης. Στα φάσματα του Micelles_Blank και της κουρκουμίνης παρατηρείται ότι η κορυφή άνω των 3000cm^{-1} εμφανίζει μικρότερη ένταση, για παράδειγμα από την κορυφή στα $1623\text{-}1649 \text{cm}^{-1}$, ενώ στο δείγμα Micelles_Cage_cur/5 εμφανίζει ίσης έντασης κορυφή κάτι που καταδεικνύει ότι μάλλον η κορυφή πλέον αφορά στις υδροξυλομάδες και του φορέα και της ένωσης. Στη συνέχεια, εμφανίζεται η χαρακτηριστική κορυφή δόνησης τάσης του υδροξυλίου της καρβοξυλομάδας του γερανικού οξέος του CAGE (1:2) στα 2915.84cm^{-1} . Έπειτα, εμφανίζεται ξεκάθαρα η χαρακτηριστική κορυφή δόνησης τάσης του καρβονυλικού δεσμού του CAGE (1:2), ενώ φαίνεται να μην αποτυπώνεται η κορυφή δόνησης τάσης των δεσμών $\text{C}=\text{O}$ της κουρκουμίνης. Οι δύο κορυφές είναι πολύ κοντινές, όμως αν παρατηρηθεί προσεκτικά το φάσμα του Micelles_Blank φαίνεται πως οι κορυφές στα 2915.84cm^{-1} και στα 1649.8cm^{-1} είναι ίδιας έντα-

σης, κάτι το οποίο φαίνεται και στο φάσμα του *Micelles_Cage_cur/5*. Άρα, μάλλον δεν αποτυπώνονται οι δύο κορυφές των καρβονυλίων κάθε ουσίας μαζί, γιατί λογικά θα αναμενόταν ενισχυμένη ένταση της κορυφής. Οπότε μάλλον δεν εμφανίζεται η κορυφή των καρβονυλίων της κουρκουμίνης σε εκείνο τον κυματαριθμό.

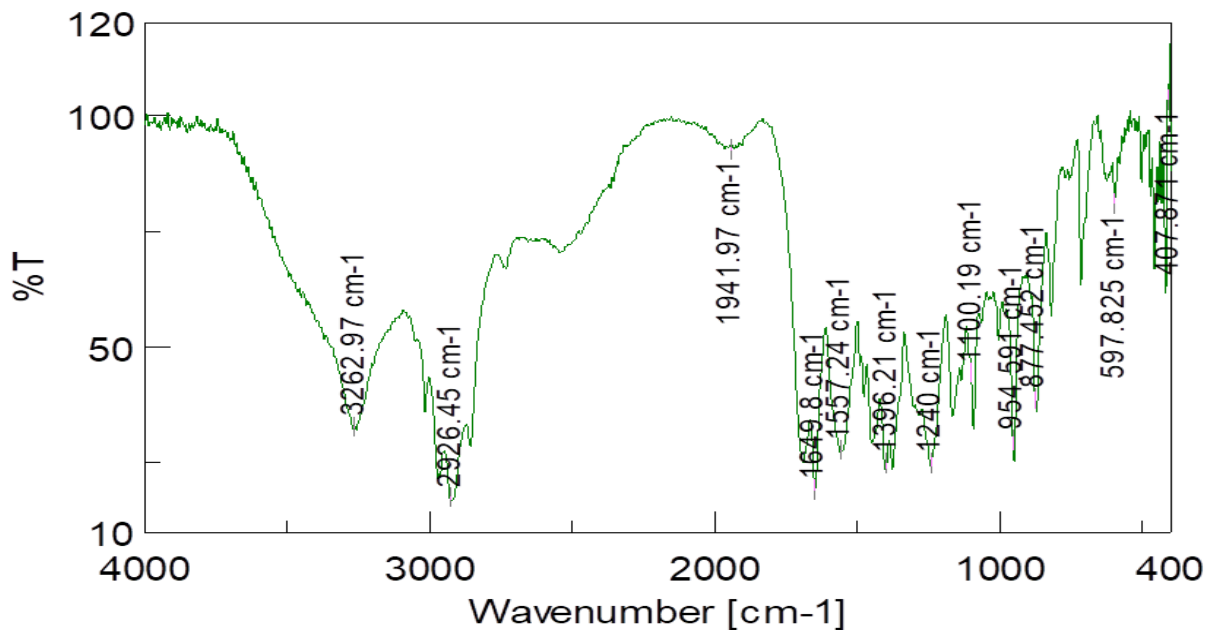


Γράφημα 15. Φάσμα IR για το *Micelles_Cage_cur/5* με αρχική περιεκτικότητα σε κουρκουμίνη 5.45mg_{κουρκουμίνη/gCAGE1:2}.

Όσον αφορά στο φάσμα του δείγματος *Micelles_Cage_cur/20*, που είναι αυτό με την αρχικά υψηλότερη περιεκτικότητα σε κουρκουμίνη, εμφανίζεται η κορυφή δόνησης τάσης του υδροξυλίου της χολίνης του CAGE (1:2) στα 3262.97cm⁻¹, όπως ακριβώς και στο τυφλό δείγμα δηλαδή το *Micelles_Blank* που περιέχει μόνο το φορέα και όχι την προς εγκλεισμό ένωση. Στη συνέχεια, η δόνηση τάσης του δεσμού C=O του γερανικού οξέος εμφανίζεται στα 1649.8cm⁻¹, όπως ακριβώς και στο τυφλό. Επίσης εμφανίζεται η κορυφή στα 2926.45cm⁻¹ και αντιπροσωπεύει τις δονήσεις τάσεις του δεσμού O-H του γερανικού μέρους του CAGE (1:2) ελαφρά μετατοπισμένη προς μεγαλύτερους κυματαριθμούς σε σχέση με το τυφλό. Ακόμα, αυτό που παρατηρείται είναι ότι στους κυματαριθμούς της περιοχής δακτυλικού αποτυπώματος (fingerprint region) οι κορυφές είναι αντίστοιχες με τις κορυφές του φορέα στο τυφλό δείγμα και παρουσιάζουν μια μικρή μετατόπιση προς υψηλότερους κυματαριθμούς.

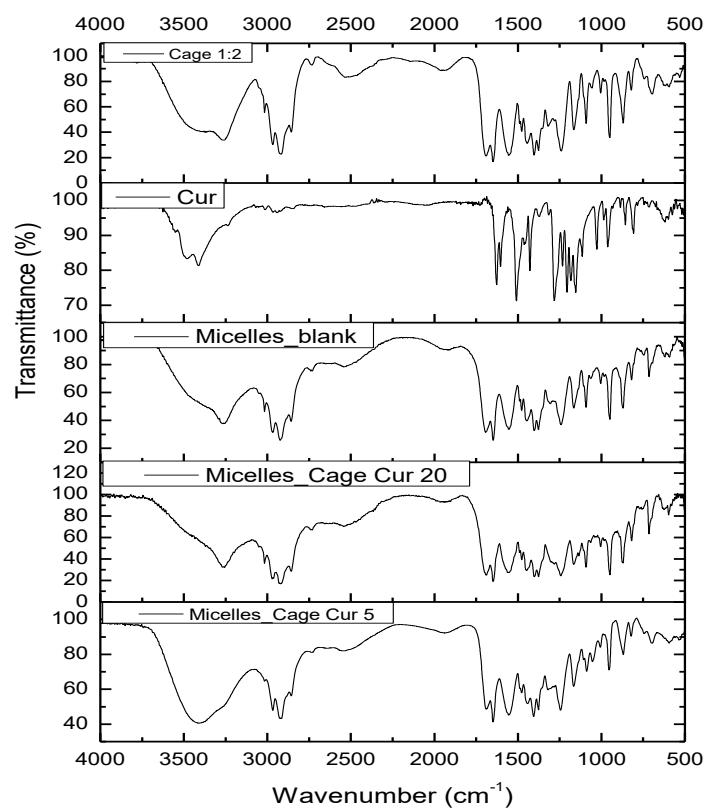
Συνεπώς, η μορφή του φάσματος του δείγματος *Micelles_Cage_cur/20* με την υψηλή αρχική περιεκτικότητα σε κουρκουμίνη προσεγγίζει εκείνη του φορέα (*Micelles_Blank*). Στο δείγμα *Micelles_Cage_cur/20* εμφανίζονται καθαρά οι κορυφές του φορέα (CAGE (1:2)) του συστήματος, ενώ δεν αποτυπώνονται οι κορυφές της ένωσης (κουρκουμίνη). Επίσης, οι περισσότερες κορυφές παρουσιάζουν μετατόπιση προς μεγαλύτερους κυματαριθμούς σε σχέση με

τις κορυφές του φορέα χωρίς την ένωση. Τα ευρήματα αυτά ενισχύουν το αποτέλεσμα, δηλαδή, πως η κουρκουμίνη έχει εγκλειστεί επιτυχώς και λαμβάνουν χώρα αλληλεπιδράσεις μεταξύ του φορέα και της ένωσης.



Γράφημα 16. Φάσμα IR για το Micelles_Cage_cur/20 με αρχική περιεκτικότητα σε κουρκουμίνη 20.33 mgκουρκουμίνη/gCAGE1:2.

Συμπερασματικά, το αραιό σε κουρκουμίνη δείγμα εμφανίζει τις κορυφές τόσο του φορέα όσο και της ένωσης και η κορυφή στα 3417.24cm^{-1} παρουσιάζει ενισχυμένη ένταση. Όσο, όμως, το δείγμα πυκνώνει σε κουρκουμίνη, τότε το φάσμα IR ομοιάζει σε αυτό του φορέα και δεν εμφανίζονται οι κορυφές της ένωσης όπως στο αραιό. Επιπλέον, παρατηρείται μετατόπιση στις κορυφές κάτι που υποδεικνύει την αλληλεπίδραση φορέα και ένωσης.



Γράφημα 17. Συγκριτική αναπαράσταση των φασμάτων IR των αρχικών συστατικών και των δειγμάτων.

Τέλος, με βάση όλα τα αποτελέσματα των χαρακτηρισμών, φαίνεται πως ο εγκλεισμός του δείγματος, στο οποίο προστίθεται αρχικά μεγαλύτερη ποσότητα κουρκουμίνης, είναι πιο επιτυχημένος.

4. Συμπεράσματα

Η παρούσα εργασία χωρίζεται σε τρία διακριτά μέρη:

- Στο πρώτο πραγματοποιείται η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός βαθέως ευτηκτικών διαλυτών και ιοντικών υγρών
- Στο δεύτερο γίνεται υπερηχητική εκχύλιση του τζίντζερ με βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες και τα εκχυλίσματα αξιολογούνται ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση και το φαινολικό φορτίο. Στη συνέχεια, τα εκχυλίσματα και οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες χρησιμοποιούνται ως πλαστικοποιητές σε βιοσυμβατά φιλμ χιτοζάνης, χαρακτηριστικά μεγέθη των οποίων προσδιορίζονται, ενώ μελετάται η αλληλεπίδραση DNA με το εκχύλισμα E/Bet:LA:W και τη σογκαόλη.
- Στο τρίτο μέρος διερευνάται η διαλυτότητα της κουρκουμίνης σε διαλύτη CAGE (1:2), η αύξηση της υδατοδιαλυτότητας της κουρκουμίνης παρουσία CAGE (1:2) και ο εγκλεισμός της σε μικκύλια CAGE (1:2), τα οποία χαρακτηρίζονται ως προς την απόδοση διεργασίας και εγκλεισμού, το μέγεθος, το δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό.

Στο πρώτο μέρος μελετώνται οι συντιθέμενοι διαλύτες. Από τα τρία ιοντικά υγρά που μελετήθηκαν μόνο το Choline hydroxide:Levulinic acid (1:1) έμεινε υγρό μετά την υπό κενό εξάτμιση. Το συγκεκριμένο ιοντικό υγρό εμφάνιζε βαθιά κόκκινο-καφέ χρώμα και ήταν ιξώδες. Στη βιβλιογραφία συνήθως συντίθεται το ιοντικό υγρό Choline Chloride:Levulinic acid (1:1), ενώ κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας ευρέθηκε η σύνθεσή του από Choline hydroxide μία ακόμα φορά στη βιβλιογραφία. Ο χαρακτηρισμός έδειξε πως έχει γίνει μεταφορά πρωτονίου, η οποία επιβεβαιώθηκε και από τη μείωση βάρους κατά την εξάτμιση. Κατά τη σύνθεση του ιοντικού υγρού από Choline Chloride παράγεται υδροχλωρίο, ενώ στην περίπτωση που μελετάται παράγεται νερό που είναι και εύκολα διαχωρίσιμο. Αυτό το εύρημα είναι ενδιαφέρον αν για οποιοδήποτε λόγο δεν είναι επιθυμητή η παραγωγή υδροχλωρίου κατά τη σύνθεση. Το συγκεκριμένο ιοντικό υγρό χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή φιλμ, αλλά απαιτούσε την προσθήκη πρόσθετου οξέος για τη μείωση του pH ώστε να διαλυθεί η χιτοζάνη. Αν και τα χαρακτηριστικά του φιλμ ήταν επιθυμητά όσον αφορά την ελαστικότητα, τη συνεκτικότητα και την ομοιομορφία, με την πάροδο του χρόνου το βάρος μειωνόταν που ενδεχομένως οφείλεται σε απώλεια του ιοντικού υγρού και ίσως του πρόσθετου οξέος. Αυτό μπορεί να είναι επιθυμητό ή όχι ανάλογα με την εφαρμογή. Γενικά, χρειάζεται περαιτέρω μελέτη του μηχανισμού μείωσης βάρους. Τα δύο υπόλοιπα ιοντικά υγρά που συντέθηκαν ήταν τα το Και τα δύο ήταν στερεά μετά από την εξάτμιση του νερού και της αιθανόλης. Ο χαρακτηρισμός τους έδειξε πως η μεταφορά πρωτονίου έχει ολοκληρωθεί, αλλά πρέπει να μελετηθεί η θερμοκρασία στερεοποίησής τους, η αναλογία των συστατικών, ή η ανάγκη ύπαρξης και τρίτου συστατικού ώστε να βρίσκονται σε υγρή κατάσταση σε θερμοκρασία δωματίου. Όταν το συστατικό είναι το βανιλικό οξύ η στερεοποίηση επέρχεται πιο γρήγορα κατά την εξάτμιση του νερού και το τελικό προϊόν δεν είναι τόσο

συμπαγές όπως με το δωδεκανοϊκό οξύ. Με τα τωρινά δεδομένα, δεν μπορούν ακόμα να καταταγούν στην κατηγορία των ιοντικών υγρών, καθώς πρέπει να διερευνηθεί το σημείο τήξης τους. Στη συνέχεια, συντέθηκε το CAGE (1:1) και (1:2). Οι δομικοί χαρακτηρισμοί συνάδουν με τη βιβλιογραφία. Όσον αφορά στο CAGE (1:1) αυτό είναι καθαρά ιοντικό υγρό και μάλιστα το φάσμα IR στην εργασία είναι το πρώτο που δίνεται στη βιβλιογραφία. Όσον αφορά στο CAGE (1:2) το πρωτόνιο του επιπλέον γερανικού οξέος δεν αποτυπώνεται στο φάσμα NMR, ενώ παρατηρείται μία ενδεχόμενη αλληλεπίδραση μεταξύ του οξυγόνου της χολίνης και του υδροξυλίου του γερανικού οξέος. Στη βιβλιογραφία γίνεται αναφορά για δεσμούς υδρογόνου που λαμβάνουν χώρα, αλλά επειδή δεν έχει εξακριβωθεί ο τρόπος αλληλεπίδρασης ενδείκνυται η λήψη φάσματος ^1H 2D NMR. Το CAGE (1:2) χρησιμοποιήθηκε ως πλαστικοποιητής σε φιλμ χιτοζάνης, όμως απαιτούνταν οξικό οξύ για τη διάλυση της χιτοζάνης. Το φιλμ που προέκυψε ήταν ανομοιόμορφο στην όψη και η χρήση οξικού οξέος επηρεάζει άμεσα τις μηχανικές ιδιότητες του φιλμ. Αυτό που συμπεραίνεται είναι ότι η χρήση οξικού οξέος σε φιλμ είναι μη επιθυμητή καθώς ελαττώνει την ελαστικότητα και γενικά, τα ιοντικά υγρά που χρησιμοποιήθηκαν, επειδή τα υδατικά τους διαλύματα δεν έχουν αρκετά χαμηλό pH για να διαλύσουν τη χιτοζάνη, κρίνονται ως μη κατάλληλοι ενισχυτές φιλμ μέχρις ότου αναπτυχθεί ένας διαφορετικός τρόπος ενσωμάτωσής του σε σχέση με το χρησιμοποιούμενο.

Για πρώτη φορά συντέθηκε το BAGE (1:3.5) ο χαρακτηρισμός του οποίου δίνει την αίσθηση ότι υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών. Ο στόχος είναι η δημιουργία ενός αντίστοιχου με το CAGE (1:2) διαλύτη. Οπτικά ομοιάζουν και στο φάσμα ^1H NMR του BAGE (1:3.5) δε φαίνεται καθαρά το πρωτόνιο του γερανικού οξέος. Τα ευρήματα είναι ενθαρρυντικά, αλλά χρειάζονται περαιτέρω χαρακτηρισμοί, όπως ^1H 2D NMR για την εύρεση αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συστατικών και τη διάταξη στο χώρο, ώστε να γίνει σαφές ότι πρόκειται για ένα νέο διαλύτη και όχι για διαλυμένη βεταΐνη σε γερανικό οξύ.

Όσον αφορά στα εκχυλίσματα αρχικά διαπιστώθηκε πως το κάθε είδος πρώτης ύλης –ξηρό ή φρέσκο– τζίντζερ έχει σημαντική επίδραση στις ιδιότητες του εκχυλίσματος. Επίσης, το μικρότερο μέγεθος κόκκων μπορεί να βελτιώσει την εκχύλιση, ενώ η χρήση νερού μπορεί να συνεισφέρει θετικά ή αρνητικά στην εκχύλιση, γιατί αφενός μειώνει το ιξώδες του φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη, αλλά το ίδιο δεν είναι τόσο καλό εκχυλιστικό μέσο. Με βάση την αντιοξειδωτική δράση και το φαινολικό περιεχόμενο, το βέλτιστο είδος τζίντζερ που μελετήθηκε ήταν το ξηρό θερμικά επεξεργασμένο εμπορικό σε μορφή σκόνης, γιατί είχε αρκετά μικρό μέγεθος πόρων, δεν περιείχε υγρασία και ανέπτυξε καλύτερη επαφή με το διαλύτη. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η εκχύλιση του ξηρού τζίντζερ με διάφορους βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες, αιθανόλη και νερό. Τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής δράσης έδειξαν πως όλα τα εκχυλίσματα με βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες παρουσιάζουν ικανοποιητική δράση, ενώ παράλληλα έχουν και ικανοποιητικό φαινολικό φορτίο. Αυτό έρχεται να επιβεβαιώσει πως οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες είναι πολύ καλά μέσα εκχύλισης βιο-

δραστικών ενώσεων. Τα εκχυλίσματα με καθαρή αιθανόλη και νερό ήταν σαφώς υποδεέστερα όσον αφορά στο φαινολικό φορτίο και την αντιοξειδωτικότητα. Όμως, όταν συνδυάζονταν ως διαλύτες λειτουργούσαν συνεργιστικά για την εκχύλιση διαφορετικών ειδών φαινολικών με αποτέλεσμα το εκχύλισμα να προκύπτει ενισχυμένο και στην αντιοξειδωτικότητα και στο φαινολικό περιεχόμενο σε σχέση με τα δύο άλλα ξεχωριστά. Παρατηρήθηκε, επίσης, πως η χρήση νερού μαζί με φυσικούς βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες μπορεί να αυξήσει το φαινολικό περιεχόμενο του εκχυλίσματος. Οι φαινολικές ενώσεις είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά, άρα, η προσθήκη νερού στον αρχικό διαλύτη εφόσον αυξάνει το φαινολικό φορτίο θα έπρεπε να αυξάνει και την αντιοξειδωτική δράση. Αυτό όπως αποτυπώνεται στα αποτελέσματα δεν είναι απαραίτητο, καθώς μπορεί οι εκχυλιζόμενες φαινολικές ενώσεις να μην είναι καλής ποιότητας ή να λειτουργούν ανταγωνιστικά. Μέσω φασμάτων IR φαίνεται πως οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες αλληλεπιδρούν με τις ενώσεις που έχουν εκχυλίσει.

Τα εκχυλίσματα και οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στην εκχύλιση λειτουργούν ως πλαστικοποιητές σε φιλμ χιτοζάνης. Αρχικά, τα υδατικά τους διαλύματα είναι αρκετά όξινα για να διαλυθεί η χιτοζάνη χωρίς προσθήκη άλλου οξέος, το οποίο είναι κάτι θετικό. Μόνο στην περίπτωση της βεταΐνης:γλυκερόλης ήταν απαραίτητη η χρήση οξικού οξέος που τελικά οδήγησε στην οξειδωση της γλυκερόλης και σε ένα καφετί εύθρυπτο φιλμ. Συνεπώς, ο συγκεκριμένος διαλύτης και το αντίστοιχο εκχύλισμα δεν είναι κατάλληλα για χρήση σε φιλμ κατ' αυτό τον τρόπο. Τα υπόλοιπα φιλμ είναι διαυγή, ελαστικά, συμπαγή και σταθερά με το χρόνο. Όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα σε πλαστικοποιητή τόσο αυξάνεται το βάρος, το πάχος και η ελαστικότητα. Αυτό συμβαίνει γιατί μετά την εξάτμιση του υδατικού στοιχείου η χιτοζάνη δημιουργεί μήτρα με περισσότερα μόρια φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη και εκχυλισμένων ενώσεων για συγκεκριμένη ποσότητα χιτοζάνης. Φιλμ χιτοζάνης (0.2% w/v Ch) προτείνεται να σχηματίζονται για περιεκτικότητες έως 3% w/v NADES ή εκχυλίσματος. Η αναλογία 1% w/v NADES ή εκχύλισμα φαίνεται να διαθέτει όλα τα επιθυμητά χαρακτηριστικά. Επιλέχθηκε η ανάλυση του εκχυλίσματος και του διαλύτη Bet:LA (1:2) περαιτέρω με διερεύνηση της διαπερατότητας του φιλμ σε υδρατμούς. Αποδείχθηκε πως η υδροφιλικότητα του διαλύτη αυτού οδηγεί σε αλληλεπίδραση με τα μόρια νερού και καλή διαπερατότητα υδρατμών, η οποία είναι επιθυμητή σε εφαρμογές επούλωσης τραυμάτων. Έπειτα, με βάση την αντιοξειδωτική δράση, το φαινολικό φορτίο και τα αποτελέσματα μελέτης των φιλμ θεωρήθηκε ως καλύτερο εκχύλισμα αυτό με διαλύτη Bet:LA (1:2).

Στη συνέχεια, αποδείχθηκε πως ο Bet:LA (1:2) αλληλεπιδρά εξωτερικά με το DNA, αλλά όχι έντονα. Από την άλλη το εκχύλισμα με διαλύτη Bet:LA (1:2) αλληλεπιδρά εξωτερικά με το DNA και προσδένεται στη μεγάλη αύλακα. Θεωρητικά είναι δύσκολο να εξεταστεί, για ποιο λόγο προσδένεται εκεί, καθώς το εκχύλισμα έχει απομονωμένες πολλές ενώσεις του τζίντζερ που μπορεί να αλληλεπιδρούν στη μικρή ή μεγάλη αύλακα της έλικας. Θεωρώντας ότι

το ξηρό τζίντζερ περιέχει σε μεγάλη πιθανότητα 6-σογκαόλη, αποδείχθηκε με νέα πειράματα ότι η 6-σογκαόλη αλληλεπιδρά με το DNA εξωτερικά, στη μεγάλη αύλακα. Τα πειράματα αυτά αποδεικνύουν πως τα εκχυλίσματα μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το DNA και να αξιοποιηθούν σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων.

Στο τρίτο μέρος της εργασίας μελετάται το CAGE (1:2) με την κουρκουμίνη. Αρχικά, αποδεικνύεται ότι το CAGE (1:2) είτε χαρακτηριστεί ιοντικό υγρό είτε βαθέως ευτηκτικός διαλύτης, δεν παύει να φέρει τις επιθυμητές ιδιότητες και των δύο ειδών διαλυτών. Αποδεικνύεται πως το CAGE (1:2) μπορεί να διαλύσει την κουρκουμίνη σε υψηλό βαθμό, άνω των 30mg/g, δηλαδή πάνω από 50000 φορές περισσότερο σε σχέση με το νερό. Αυτό μπορεί να συμβαίνει μέσω πολλών αλληλεπιδράσεων που ενδεχομένως λαμβάνουν χώρα και δεσμούς υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των μορίων του διαλύτη και του διαλύτη και της ένωσης. Τα φάσματα IR που ελήφθησαν στα πλαίσια του εγκλεισμού δείχνουν πως το CAGE (1:2) αλληλεπιδρά με την ένωση. Επιπρόσθετα, ανακαλύφθηκε πως η παρουσία του CAGE (1:2) σε υδατικό μέσο αυξάνει την υδατοδιαλυτότητα της κουρκουμίνης έως και 1.5mg/mL για περιεκτικότητα 0.43mg/g σε CAGE (1:2). Με λίγα λόγια η διαλυτότητα της κουρκουμίνης σε υδατικό μέσο αυξήθηκε έως και 2500 φορές. Η σπουδαιότητα του εγχειρήματος αυτού είναι πως αποδείχθηκε πως παρουσία CAGE (1:2) είναι δυνατή η αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας της –κατά τα άλλα μη υδατοδιαλυτής– κουρκουμίνης και μπορεί πλέον να αξιοποιηθεί σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων.

Εκτός των άλλων στην εργασία έγινε και αξιοποίηση της ικανότητας σχηματισμού μικκυλίων CAGE (1:2) σε υδατικό μέσο. Διερευνήθηκε, λοιπόν, ο εγκλεισμός της κουρκουμίνης σε δύο διαφορετικές περιεκτικότητες σε μικκύλια CAGE (1:2). Ευρέθηκε πως ο εγκλεισμός παρουσιάζει αποδόσεις της τάξεως του 85%. Η μεγάλη διαφορά με τους συνήθεις εγκλεισμούς είναι πως το προϊόν μετά τη λυοφιλοποίηση είναι υγρό, καθώς το CAGE (1:2) δεν εξαχνώνεται. Μέσω του χαρακτηρισμού των σωματιδίων του CAGE (1:2) ευρέθηκε πως η διαδικασία του εγκλεισμού επηρεάζει τη δομή των σωματιδίων, καθώς το δείγμα CAGE (1:2) που έχει υποστεί εγκλεισμό εμφανίζει πολύ μικρότερα μεγέθη σωματιδίων, τα οποία είναι πολύ πιο σταθερά και η διασπορά του ομοιογενής. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι με τη διαδικασία που ακολουθήθηκε δημιουργείται μια πιο τακτική και σταθερή δομή. Όσον αφορά στα δείγματα του εγκλεισμού προέκυψαν σωματίδια μεγέθους 146.9nm και 278.6nm για περιεκτικότητες κουρκουμίνης 5.45 και 20.33mg/g αντίστοιχα. Επομένως, η κουρκουμίνη αλληλεπιδρά με το CAGE (1:2) και ενθυλακώνεται στο εσωτερικό των μικκυλίων αυξάνοντας το μέγεθός τους. Τα σωματίδια με εγκλεισμένη κουρκουμίνη σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα εμφανίζονται να είναι πιο σταθερά και μάλιστα η διασπορά τους είναι περισσότερο ομοιογενής. Μελέτες έδειξαν ότι η κουρκουμίνη είναι εγκλεισμένη και δεν υπάρχει εξωτερικά των σωματιδίων σε υπολογίσιμη ποσότητα. Τα φάσματα IR των δειγμάτων καταδεικνύουν επίσης ότι υπάρχει πράγματι αλληλεπίδραση φορέα και ένωσης, ενώ ειδικά για το δείγμα υψηλής περιεκτικότητας σε κουρκουμίνη αποτυπώνονται μόνοι οι κορυφές του φορέα. Τα ευρήματα των χαρακτηρισμών των δειγμάτων καταδεικνύουν ένα επιτυχή εγκλεισμό της

κουρκουμίνης στα μικκύλια του CAGE (1:2). Το είδος αυτό του συστήματος είναι καινοτόμο και δεν έχει μελετηθεί εκτενώς στη βιβλιογραφία. Επίσης, από τα αποτελέσματα προκύπτει πως ο εγκλεισμός μεγαλύτερης περιεκτικότητας κουρκουμίνης ίσως είναι αποτελεσματικότερος από ότι για μικρότερες περιεκτικότητες. Συμπεραίνεται πως ο εγκλεισμός της κουρκουμίνης σε μικκύλια CAGE (1:2) εξαρτάται από την περιεκτικότητα της προς εγκλεισμό κουρκουμίνης και τη διάρκεια ανάδευσης κατά το σχηματισμό των μικκυλίων. Η απόδοση είναι γενικά ικανοποιητική και τα σωματίδια κατάλληλου μεγέθους και διασποράς για εφαρμογές ως σύστημα μεταφοράς κουρκουμίνης.

5. Προτάσεις για το μέλλον

Η παραπάνω μελέτη δίνει ενθαρρυντικά αποτελέσματα για περαιτέρω διερεύνηση των συστημάτων που πραγματεύεται. Κατ' αρχάς, μπορεί να γίνει ανάλυση τοξικότητας του ιοντικού υγρού Choline hydroxide:Levulinic acid (1:1) και ανάλογα με τα αποτελέσματα αυτά να χρησιμοποιηθεί δια διάλυση βιοδραστικών ενώσεων ή ακόμα και εκχύλιση αυτών από φυτικές πρώτες ύλες.

Όσον αφορά στην εκχύλιση του τζίντζερ προκύπτουν πολλά ζητήματα που μπορούν να μελετηθούν. Πρώτον, μπορεί να μελετηθεί η αναλογία σε νερό του φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη για μεγιστοποίηση της απόδοσης εκχύλισης. Κατά δεύτερον, μπορεί να αναπτυχθεί μεθοδολογία ανάκτησης του βαθέως ευτηκτικού διαλύτη από το εκχύλισμα του τζίντζερ ενδεχομένως με αντιδιαλύτη ή αντίστροφη εκχύλιση στερεής φάσης^[113] και μελέτη της νέας εκχυλιστικής ικανότητας του ανακτημένου διαλύτη. Επίσης, τα υπολείμματα στερεού τζίντζερ μετά το πέρας της εκχύλισης δεν πρέπει να θεωρούνται απόβλητο, αλλά χρήσιμο προϊόν για την παραγωγή άλλων προϊόντων, όπως λεβουλινικό οξύ. Με την ανάκτηση και την επεξεργασία των υπολειμμάτων αυξάνεται ο πράσινος χαρακτήρας της διεργασίας και δημιουργείται μία κυκλική αξιοποίηση των υλών.

Στη συνέχεια, μπορεί να γίνει ανάλυση και ταυτοποίηση των ενώσεων του τζίντζερ που περιέχονται στα εκχυλίσματα, ώστε να μελετηθεί η επίδραση του διαλύτη στην εκχύλιση της εκάστοτε ένωσης, η συνεισφορά της κάθε ένωσης στην αντιοξειδωτική δράση, η συνεργιστικό ή ανταγωνιστικός χαρακτήρας μεταξύ των ενώσεων και η επίδραση των συνθηκών εκχύλισης στην περιεκτικότητα του εκχυλίσματος σε κάθε ένωση. Επιπλέον, μέσω της διαδικασίας ταυτοποίησης μπορεί να γίνει πιο εκτεταμένη μελέτη του βαθμού επίδρασης της κάθε ένωσης στη συνολική αλληλεπίδραση του εκχυλίσματος με το DNA και να ακολουθήσει ανάπτυξη συστήματος μεταφοράς εκχυλίσματος σε καρκινικά κύτταρα. Επιπρόσθετα, μπορούν να αξιοποιηθούν τα ενισχυμένα με εκχύλισμα φιλμ χιτοζάνης ως ενεργές συσκευασίες φρούτων και να διερευνηθεί η επιρροή της φύσης του εκχυλίσματος και της περιεκτικότητας του φιλμ σε εκχύλισμα στο χρόνο επέκτασης ζωής αυτών.

Όσον αφορά στο σύστημα CAGE (1:2) με την κουρκουμίνη είναι αναγκαία η διεξαγωγή μελέτης για τον προσδιορισμό του προφίλ απελευθέρωσης της κουρκουμίνης. Επίσης, πρέπει να γίνουν μελέτες για τη μορφολογία τόσο του διαλύματος CAGE (1:2)-κουρκουμίνης όσο και των σωματιδίων μετά των εγκλεισμό, ίσως μέσω SEM/TEM. Από τις πολύ σημαντικές μελέτες θα ήταν ακόμα η διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του CAGE (1:2) και της κουρκουμίνης, καθώς επίσης να προσδιοριστεί εάν όταν διαλύεται η κουρκουμίνη σε CAGE (1:2) αυτή σταθεροποιείται ή όχι. Αυτό θα μπορούσε να γίνει μέσω τεχνητής έκθεσης του διαλύματος σε συγκεκριμένη ένταση φωτός και να μελετάται σε φασματοφωτόμετρο η κουρκουμίνη που δεν έχει υποβαθμιστεί. Συμπληρωματικά, καλό είναι να γίνει μελέτη τοξικότητας του CAGE (1:2), καθώς και των σωματιδίων CAGE (1:2)-κουρκουμίνης. Ακόμα, μπορεί να δημιουργηθεί CAGE σε διάφορες συγκεντρώσεις γερανικού για να ευρεθεί κατά πόσο

τα συστατικά επηρεάζουν την τοξικότητα του τελικού διαλύτη. Επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και το CAGE (1:1) για διάλυση της κουρκουμίνης και σχετική σύγκριση με το CAGE (1:2).

Τέλος, όσον αφορά στο CAGE (1:2) πρέπει να ακολουθήσουν δομικοί και μορφολογικοί χαρακτηρισμοί για να εξακριβωθεί η μορφολογία και η τρισδιάστατη δομή του και οι αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα και να ενταχθεί σε μία κατηγορία διαλυτών, κάτι που δεν έχει γίνει έως και σήμερα στη βιβλιογραφία. Για το BAGE (1:3.5) θα πρέπει να γίνουν συμπληρωματικοί δομικοί χαρακτηρισμοί, όπως ^1H 2D NMR, ώστε να επιβεβαιωθεί εάν τελικά πρόκειται για ένα νέο διαλύτη. Το BAGE (1:3.5) μπορεί να χρησιμοποιηθεί και αυτό σε μελέτες εγκλεισμού καθώς έχει τη δυνατότητα σχηματισμού σωματιδίων σε υδατικό μέσο.

Βιβλιογραφία

- [1] P. T. Anastas and J. C. Warner, *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, Oxford, 1998
- [2] Melissa Fellet, *Green Chemistry and Engineering: Towards a Sustainable Future*, e American Chemical Society, 2013
- [3] Erythropel, H. C., Zimmerman, J. B., de Winter, T. M., Petitjean, L., Melnikov, F., Lam, C. H., Anastas, P. T. (2018). The Green ChemisTREE: 20 years after taking root with the 12 principles. *Green Chemistry*, 20(9), 1929–1961. doi:10.1039/c8gc00482j
- [4] American, Chemical Society, What Is Green Chemistry?, <https://www.acs.org/content/acs/en/greenchemistry/what-is-green-chemistry.html>
- [5] Lewandowski, T. A. (2014). Green Chemistry. *Encyclopedia of Toxicology*, 798–799. doi:10.1016/b978-0-12-386454-3.01020-4
- [6] Ghandi, K. (2014). A Review of Ionic Liquids, Their Limits and Applications. *Green and Sustainable Chemistry*, 04(01), 44–53. doi:10.4236/gsc.2014.41008
- [7] Wilkes, J. S. (2002). A short history of ionic liquids—from molten salts to neoteric solvents. *Green Chemistry*, 4(2), 73–80. doi:10.1039/b110838g
- [8] Shamshina, J. L., Zavgorodnya, O., & Rogers, R. D. (2018). Ionic Liquids. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. doi:10.1016/b978-0-12-409547-2.13931-9
- [9] Zhang, S., Wang, J., Lu, X., & Zhou, Q. (Eds.). (2014). *Structures and Interactions of Ionic Liquids. Structure and Bonding*. doi:10.1007/978-3-642-38619-0
- [10] Ionic Liquids: Solvents of the Future? Author(s): Robin D. Rogers and Kenneth R. Seddon Source: *Science, New Series*, Vol. 302, No. 5646 (Oct.31, 2003), pp. 792-793 Published by: American Association for the Advancement of Science Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/3835533> Accessed: 16-10-2015 20:25 UTC
- [11] Welton, T. (2018). Ionic liquids: a brief history. *Biophysical Reviews*, 10(3), 691–706. doi:10.1007/s12551-018-0419-2
- [12] Lei, Z., Chen, B., Koo, Y.-M., & MacFarlane, D. R. (2017). Introduction: Ionic Liquids. *Chemical Reviews*, 117(10), 6633–6635. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00246
- [13] Lopes, J. N. C.; Rebelo, L. P. N., Ionic liquids and reactive azeotropes: the continuity of the aprotic and protic classes. *Physical Chemistry Chemical Physics* 2010, 12 (8), 1948-1952.
- [14] Tokyo Chemical Industry, Ionic Liquids, Products Brochure, <https://www.tcichemicals.com/TH/en/c/12582>
- [15] Tzani, A., Douka, A., Papadopoulos, A., Pavlatou, E. A., Voutsas, E., & Detsi, A. (2013). Synthesis of Biscoumarins Using Recyclable and Biodegradable Task-Specific Ionic Liquids. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 1(9), 1180–1185. doi:10.1021/sc4001093
- [16] Tsanas, C., Tzani, A., Papadopoulos, A., Detsi, A., & Voutsas, E. (2014). Ionic liquids as entrainers for the separation of the ethanol/water system. *Fluid Phase Equilibria*, 379, 148–156. doi:10.1016/j.fluid.2014.07.022
- [17] Gjineci, N., Boli, E., Tzani, A., Detsi, A., & Voutsas, E. (2016). Separation of the ethanol/water azeotropic mixture using ionic liquids and deep eutectic solvents. *Fluid Phase Equilibria*, 424, 1–7. doi:10.1016/j.fluid.2015.07.048
- [18] Honarmand, M., Tzani, A., & Detsi, A. (2019). Synthesis of novel multi-OH functionalized ionic liquid and its application as dual catalyst-solvent for the one-pot synthesis 4H-pyrans. *Journal of Molecular Liquids*, 111358. doi:10.1016/j.molliq.2019.111358

- [19] Papadopoulou, A. A., Tzani, A., Polydera, A. C., Katapodis, P., Voutsas, E., Detsi, A., & Stamatis, H. (2017). Green biotransformations catalysed by enzyme-inorganic hybrid nanoflowers in environmentally friendly ionic solvents. *Environmental Science and Pollution Research*. doi:10.1007/s11356-017-9271-3
- [20] Papadopoulou, A. A., Tzani, A., Alivertis, D., Katsoura, M. H., Polydera, A. C., Detsi, A., & Stamatis, H. (2016). Hydroxyl ammonium ionic liquids as media for biocatalytic oxidations. *Green Chemistry*, 18(4), 1147–1158. doi:10.1039/c5gc02381e
- [21] Tzani, A., Koutsoukos, S., Koukouzelis, D., & Detsi, A. (2017). Synthesis and characterization of silver nanoparticles using biodegradable protic ionic liquids. *Journal of Molecular Liquids*, 243, 212–218. doi:10.1016/j.molliq.2017.08.039
- [22] Das, R. N.; Roy, K., *Advances in QSPR/QSTR models of ionic liquids for the design of greener solvents of the future. Molecular diversity 2013*, 17 (1), 151-96
- [23] Papadopoulou, A. A., Tzani, A., Alivertis, D., Katsoura, M. H., Polydera, A. C., Detsi, A., & Stamatis, H. (2016). Hydroxyl ammonium ionic liquids as media for biocatalytic oxidations. *Green Chemistry*, 18(4), 1147–1158. doi:10.1039/c5gc02381e
- [24] Tzani, A., Elmaloglou, M., Kyriazis, C., Aravopoulou, D., Kleidas, I., Papadopoulos, A., ... Detsi, A. (2016). Synthesis and structure-properties relationship studies of biodegradable hydroxylammonium-based protic ionic liquids. *Journal of Molecular Liquids*, 224, 366–376. doi:10.1016/j.molliq.2016.09.086
- [25] Martins, M. A. R., Pinho, S. P., & Coutinho, J. A. P. (2018). Insights into the Nature of Eutectic and Deep Eutectic Mixtures. *Journal of Solution Chemistry*. doi:10.1007/s10953-018-0793-1
- [26] Smith, E. L., Abbott, A. P., & Ryder, K. S. (2014). Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chemical Reviews*, 114(21), 11060–11082. doi:10.1021/cr300162p
- [27] Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R. L., & Duarte, A. R. C. (2014). Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(5), 1063–1071. doi:10.1021/sc500096j
- [28] Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G.-J., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2013). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*, 766, 61–68. doi:10.1016/j.aca.2012.12.019
- [29] Zhang, Q., De Oliveira Vigier, K., Royer, S., & Jérôme, F. (2012). Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chemical Society Reviews*, 41(21), 7108. doi:10.1039/c2cs35178a
- [30] Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K., & Tambyrajah, V. (2002). Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures Electronic supplementary information (ESI) available: spectroscopic data. See <http://www.rsc.org/suppdata/cc/b2/b210714g/>. *Chemical Communications*, (1), 70–71. doi:10.1039/b210714g
- [31] Yanrong Liu, Zhengxing Dai, Fei Dai, Xiaoyan Ji (2020) Ionic Liquids/Deep Eutectic Solvents-Based Hybrid Solvents for CO₂ Capture, *Crystals*, 10, 978. doi:10.3390/cryst10110978
- [32] Choi, Y. H., van Spronsen, J., Dai, Y., Verberne, M., Hollmann, F., Arends, I. W. C. E., ... Verpoorte, R. (2011). Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology? *PLANT PHYSIOLOGY*, 156(4), 1701–1705. doi:10.1104/pp.111.178426
- [33] Abbott AP, Capper G, Davies DL, Rasheed RK, Tambyrajah V. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chem Commun (Camb)*. 2003 Jan 7;(1):70-1. doi: 10.1039/b210714g. PMID: 12610970.

- [34] Geow, C. H., Tan, M. C., Yeap, S. P., Chin, N. L., A Review on Extraction Techniques and Its Future Applications in Industry. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2021, 123, 2000302. <https://doi.org/10.1002/ejlt.202000302>
- [35] Zainal-Abidin, M. H., Hayyan, M., Hayyan, A., & Jayakumar, N. S. (2017). New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: A review. *Analytica Chimica Acta*, 979, 1–23. doi:10.1016/j.aca.2017.05.012
- [36] Komal Patel, Namrata Panchal, Dr. Pradnya Ingle, Review of Extraction Techniques *International Journal of Advanced Research in Chemical Science* 2019, 6(3) : 06-21.
- [37] Zhang, Q.-W., Lin, L.-G., & Ye, W.-C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine*, 13(1). doi:10.1186/s13020-018-0177-x
- [38] Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ... Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014
- [39] Medina-Torres, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., Sánchez-Contreras, A., & Pacheco, N. (2017). Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy*, 7(3), 47. doi:10.3390/agronomy7030047
- [40] Chemat F, Vian MA, Cravotto G. Green extraction of natural products: concept and principles. *Int J Mol Sci.* 2012;13(7):8615-27. doi: 10.3390/ijms13078615. Epub 2012 Jul 11. PMID: 22942724; PMCID: PMC3430255.
- [41] Singletary, K. (2010). Ginger. *Nutrition Today*, 45(4), 171–183. doi:10.1097/nt.0b013e3181ed3543
- [42] Lee S, Khoo C, Halstead CW, Huynh T, Bensoussan A. Liquid chromatographic determination of 6-, 8-, 10-gingerol, and 6-shogaol in ginger (*Zingiber officinale*) as the raw herb and dried aqueous extract. *J AOAC Int.* 2007 Sep-Oct;90(5):1219-26. PMID: 17955965.
- [43] Prasad, S., & Tyagi, A. K. (2015). Ginger and Its Constituents: Role in Prevention and Treatment of Gastrointestinal Cancer. *Gastroenterology Research and Practice*, 2015, 1–11. doi:10.1155/2015/142979
- [44] Mao, Q.-Q., Xu, X.-Y., Cao, S.-Y., Gan, R.-Y., Corke, H., Beta, T., & Li, H.-B. (2019). Bioactive Compounds and Bioactivities of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Foods*, 8(6), 185. doi:10.3390/foods8060185
- [45] Masuda, Y., Kikuzaki, H., Hisamoto, M., & Nakatani, N. (2004). Antioxidant properties of gingerol related compounds from ginger. *BioFactors*, 21(1-4), 293–296. doi:10.1002/biof.552210157
- [46] Shirin, A. P. R., & Jamuna, P. (2010). Chemical composition and antioxidant properties of ginger root (*Zingiber officinale*). *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(24), 2674–2679. doi:10.5897/jmpr09.464
- [47] Mukherjee, S., Mandal, N., Dey, A., & Mondal, B. (2012). An approach towards optimization of the extraction of polyphenolic antioxidants from ginger (*Zingiber officinale*). *Journal of Food Science and Technology*, 51(11), 3301–3308. doi:10.1007/s13197-012-0848-z
- [48] Mbaveng, A. T., & Kuete, V. (2017). *Zingiber officinale*. *Medicinal Spices and Vegetables from Africa*, 627–639. doi:10.1016/b978-0-12-809286-6.00030-3
- [49] Hsieh, Y.-H., Li, Y., Pan, Z., chen, Z., Lu, J., Yuan, J., ... Zhang, J. (2019). Ultrasonication-assisted synthesis of alcohol-based deep eutectic solvents for extraction of active compounds from ginger. *Ultrasonics Sonochemistry*, 104915. doi:10.1016/j.ultsonch.2019.104915
- [50] Gustav Pabst, Köhler's *Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte: Atlas zur Pharmacopoea germanica, austriaca, belgica, danica, helvetica, hungarica, rossica*,

suecica, Neerlandica, British pharmacopoeia, zum Codex medicamentarius, sowie zur Pharmacopoeia of the United States of America., Franz Eugen Köhler, 1896

[51] National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 3473, [6]-Gingerol. Retrieved June 4, 2021 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6-Gingerol>.

[52] Aleksić MM, Kapetanović V. An overview of the optical and electrochemical methods for detection of DNA - drug interactions. *Acta Chim Slov.* 2014;61(3):555-73. PMID: 25286211.

[53] Paul, Ananya, and Santanu Bhattacharya. "Chemistry and Biology of DNA-Binding Small Molecules." *Current Science*, vol. 102, no. 2, 2012, pp. 212–231..

[54] Gilad, Y., & Senderowitz, H. (2013). Docking Studies on DNA Intercalators. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 54(1), 96–107. doi:10.1021/ci400352t

[55] Haris, P., Mary, V., & Sudarsanakumar, C. (2018). Probing the interaction of the phytochemical 6-gingerol from the spice ginger with DNA. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 124–131. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.02.099

[56] Sha, Y., Chen, X., Niu, B., & Chen, Q. (2017). The Interaction Mode of Groove Binding Between Quercetin and Calf Thymus DNA Based on Spectrometry and Simulation. *Chemistry & Biodiversity*, 14(10), e1700133. doi:10.1002/cbdv.201700133

[57] Dutta, Pradip & Dutta, Joydeep & Tripathi, V. (2003). Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *J Sci Indus Res.* 63.

[58] Siripatrawan, U. (2016). Active food packaging from chitosan incorporated with plant polyphenols. *Novel Approaches of Nanotechnology in Food*, 465–507. doi:10.1016/b978-0-12-804308-0.00014-5

[59] Mujtaba, M., Morsi, R. E., Kerch, G., Elsabee, M. Z., Kaya, M., Labidi, J., & Khawar, K. M. (2018). Current advancements in chitosan-based film production for food technology; A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.10.109

[60] Rathke, T. D., & Hudson, S. M. (1994). Review of Chitin and Chitosan as Fiber and Film Formers. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*, 34(3), 375–437. doi:10.1080/15321799408014163

[61] H.P.S, A. K., Saurabh, C. K., A.S., A., Nurul Fazita, M. R., Syakir, M. I., Davoudpour, Y., ... Dungani, R. (2016). A review on chitosan-cellulose blends and nanocellulose reinforced chitosan biocomposites: Properties and their applications. *Carbohydrate Polymers*, 150, 216–226. doi:10.1016/j.carbpol.2016.05.028

[62] National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 71853, Chitosan, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chitosan>.

[63] Lozano-Navarro, J., Díaz-Zavala, N., Velasco-Santos, C., Melo-Banda, J., Páramo-García, U., Paraguay-Delgado, F., Zapién-Castillo, S. (2018). Chitosan-Starch Films with Natural Extracts: Physical, Chemical, Morphological and Thermal Properties. *Materials*, 11(1), 120. doi:10.3390/ma11010120

[64] Ferreira, A. S., Nunes, C., Castro, A., Ferreira, P., & Coimbra, M. A. (2014). Influence of grape pomace extract incorporation on chitosan films properties. *Carbohydrate Polymers*, 113, 490–499. doi:10.1016/j.carbpol.2014.07.032

[65] Elsabee, M. Z., & Abdou, E. S. (2013). Chitosan based edible films and coatings: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 33(4), 1819–1841. doi:10.1016/j.msec.2013.01.010

[66] Kumar, M. N. V. R., Muzzarelli, R. A. A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., & Domb, A. J. (2004). Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. *Chemical Reviews*, 104(12), 6017–6084. doi:10.1021/cr030441b

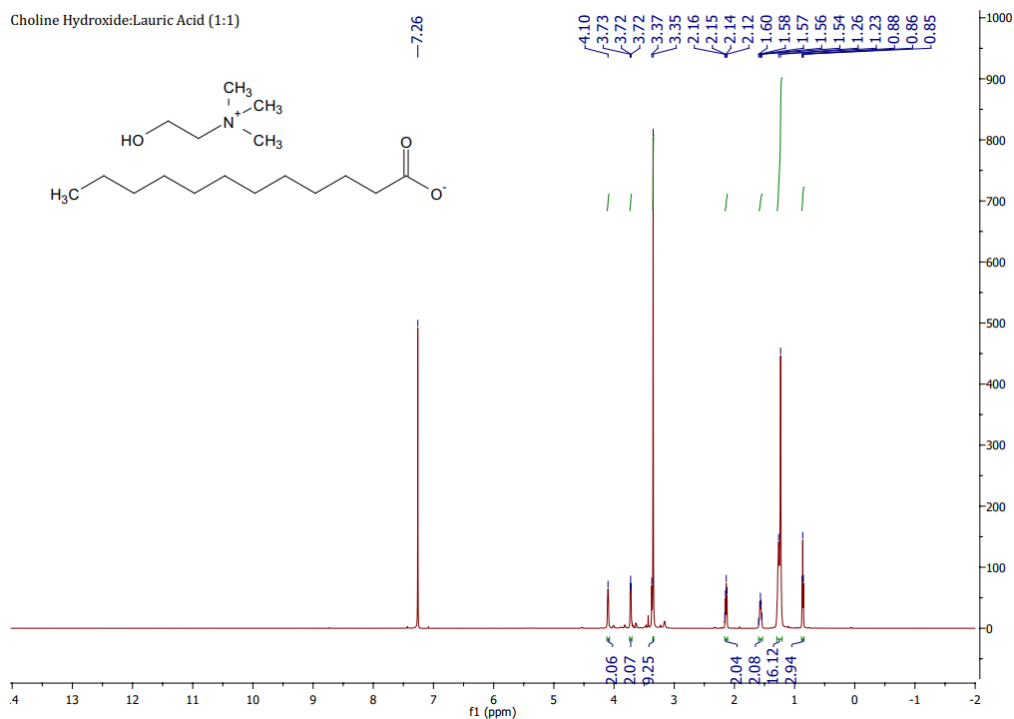
- [67] Gupta, Arvind & Pal, Akhilesh & Patwa, Rahul & Dhar, Prodyut & Katiyar, Vimal. (2018). Green composites films with excellent barrier properties. 10.1002/9781119323327.ch12.
- [68] Jakubowska, E., Gierszewska, M., Nowaczyk, J., & Olewnik-Kruszkowska, E. (2020). Physicochemical and storage properties of chitosan-based films plasticized with deep eutectic solvent. *Food Hydrocolloids*, 108, 106007. doi:10.1016/j.foodhyd.2020.106007
- [69] Antonella Rozaria Nefeli Pontillo, Spyridon Koutsoukos, Tom Welton and Anastasia Detsi, Investigation of the influence of natural deep eutectic solvents (NaDES) in the properties of chitosan-stabilised films, Royal Society of Chemistry (2021), DOI: 10.1039/d0ma01008a
- [70] Stohs, S. J., Chen, O., Ray, S. D., Ji, J., Bucci, L. R., & Preuss, H. G. (2020). Highly Bioavailable Forms of Curcumin and Promising Avenues for Curcumin-Based Research and Application: A Review. *Molecules*, 25(6), 1397. doi:10.3390/molecules25061397
- [71] Hewlings, S., & Kalman, D. (2017). Curcumin: A Review of Its' Effects on Human Health. *Foods*, 6(10), 92. doi:10.3390/foods6100092
- [72] Priyadarsini, K. (2014). The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent. *Molecules*, 19(12), 20091–20112. doi:10.3390/molecules191220091
- [73] World Health Organization, WHO Consultation on Selected Medicinal Plants, WHO Consultation on Selected Medicinal Plants (2nd : 1999 : Ravello-Salerno, Italy)
- [74] Jeliński, T., Przybyłek, M., & Cysewski, P. (2019). Natural Deep Eutectic Solvents as Agents for Improving Solubility, Stability and Delivery of Curcumin. *Pharmaceutical Research*, 36(8). doi:10.1007/s11095-019-2643-2
- [75] Md Raihan, C., Moshikur, R. M., Wakabayashi, R., Tahara, Y., Kamiya, N., Moniruzzaman, M., & Goto, M. (2019). Development of a novel ionic liquid-curcumin complex to enhance its solubility, stability, and activity. *Chemical Communications*. doi:10.1039/c9cc02812a
- [76] Li, J., Wang, Z., Yao, S., & Song, H. (2020). Aqueous solubilization and extraction of curcumin enhanced by imidazolium, quaternary ammonium, and tropine ionic liquids, and insight of ionic liquids-curcumin interaction. *Journal of Molecular Liquids*, 113906. doi:10.1016/j.molliq.2020.113906
- [77] Sa, G., & Das, T. (2008). Anti cancer effects of curcumin: cycle of life and death. *Cell Division*, 3(1), 14. doi:10.1186/1747-1028-3-14
- [78] Bhat, A., Mahalakshmi, A. M., Ray, B., Tuladhar, S., Hediya, T. A., Manthiannem, E., ... Sakharkar, M. K. (2019). Benefits of curcumin in brain disorders. *BioFactors*. doi:10.1002/biof.1533
- [79] Pinto Reis, C., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J., & Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2(1), 8–21. doi:10.1016/j.nano.2005.12.003
- [80] Kumari, Avnesh & Singla, Rubbel & Guliani, Anika & Yadav, Sudesh. (2014). Nanoencapsulation for drug delivery. *EXCLI Journal*. 13. 265-286. 10.17877/DE290R-15592.
- [81] Heinz, H., Pramanik, C., Heinz, O., Ding, Y., Mishra, R. K., Marchon, D., ... Ziolo, R. F. (2017). Nanoparticle decoration with surfactants: Molecular interactions, assembly, and applications. *Surface Science Reports*, 72(1), 1–58. doi:10.1016/j.surfrep.2017.02.001
- [82] Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L. F., Campos, E. V. R., Rodriguez-Torres, M. del P., Acosta-Torres, L. S., ... Shin, H.-S. (2018). Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1). doi:10.1186/s12951-018-0392-8
- [83] Chamundeeswari, M., Jeslin, J., & Verma, M. L. (2018). Nanocarriers for drug delivery applications. *Environmental Chemistry Letters*. doi:10.1007/s10311-018-00841-1

- [84] Shao, J., Fang, Y., Zhao, R., Chen, F., Yang, M., Jiang, J., ... Jia, L. (2020). Evolution from small molecule to nano-drug delivery systems - An emerging approach for cancer therapy of ursolic acid. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. doi:10.1016/j.ajps.2020.03.001
- [85] Yang, X., Li, Z., Wang, N., Li, L., Song, L., He, T., ... Gong, C. (2015). Curcumin-Encapsulated Polymeric Micelles Suppress the Development of Colon Cancer In Vitro and In Vivo. *Scientific Reports*, 5(1). doi:10.1038/srep10322
- [86] Chen, Y., Lu, Y., Lee, R. J., & Xiang, G. (2020). Nano Encapsulated Curcumin: And Its Potential for Biomedical Applications. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 15, 3099–3120. doi:10.2147/ijn.s210320
- [87] Lee, J. H., & Yeo, Y. (2015). Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. *Chemical engineering science*, 125, 75-84
- [88] Simone S. Silva, Joana M. Gomes, Rui L. Reis, and Subhas C. Kundu, Green Solvents Combined with Bioactive Compounds as Delivery Systems: Present Status and Future Trends. *ACS Applied Bio Materials* 2021 4 (5), 4000-4013, DOI: 10.1021/acsbm.1c00013
- [89] Zakrewsky, M., Lovejoy, K. S., Kern, T. L., Miller, T. E., Le, V., Nagy, A., ... Mitragotri, S. (2014). Ionic liquids as a class of materials for transdermal delivery and pathogen neutralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(37), 13313–13318. doi:10.1073/pnas.1403995111
- [90] Zakrewsky, M., Banerjee, A., Apte, S., Kern, T. L., Jones, M. R., Sesto, R. E. D., ... Mitragotri, S. (2016). Choline and Geranate Deep Eutectic Solvent as a Broad-Spectrum Antiseptic Agent for Pre-ventive and Therapeutic Applications. *Advanced Healthcare Materials*, 5(11), 1282–1289. doi:10.1002/adhm.201600086
- [91] Rogers, R. D., & Gurau, G. (2018). Is “choline and geranate” an ionic liquid or deep eutectic solvent system? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201814976. doi:10.1073/pnas.1814976115
- [92] Banerjee, A., Ibsen, K., Brown, T., Chen, R., Agatemor, C., & Mitragotri, S. (2018). Reply to Rogers and Gurau: Definitions of ionic liquids and deep eutectic solvents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201815526. doi:10.1073/pnas.1815526115
- [93] Nicole Skinner, *Nature magazine*, 2014, August 25, Liquid Salts Bypass Skin to Treat Infections, <https://www.scientificamerican.com/article/liquid-salts-bypass-skin-to-treat-infections/>
- [94] Banerjee, A., Ibsen, K., Iwao, Y., Zakrewsky, M., & Mitragotri, S. (2017). Transdermal Protein Delivery Using Choline and Geranate (CAGE) Deep Eutectic Solvent. *Advanced Healthcare Materials*, 6(15), 1601411. doi:10.1002/adhm.201601411
- [95] Ibsen, K. N., Ma, H., Banerjee, A., Tanner, E. E. L., Nangia, S., & Mitragotri, S. (2018). Mechanism of Antibacterial Activity of Choline-Based Ionic Liquids (CAGE). *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 4(7), 2370–2379. doi:10.1021/acsbiomaterials.8b00486
- [96] Greene, J. R., Merrett, K. L., Heyert, A. J., Simmons, L. F., Migliori, C. M., Vogt, K. C., ... Koppisch, A. T. (2019). Scope and efficacy of the broad-spectrum topical antiseptic choline geranate. *PLOS ONE*, 14(9), e0222211. doi:10.1371/journal.pone.0222211
- [97] Tanner, E. E. L., Piston, K. M., Ma, H., Ibsen, K. N., Nangia, S., & Mitragotri, S. (2019). The Influence of Water on Choline-Based Ionic Liquids. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. doi:10.1021/acsbiomaterials.9b00243
- [98] Di Lecce, S., Lazarou, G., Khalit, S. H., Adjiman, C. S., Jackson, G., Galindo, A., & McQueen, L. (2019). Modelling and prediction of the thermophysical properties of aqueous mixtures of choline geranate and geranic acid (CAGE) using SAFT- γ Mie. *RSC Advances*, 9(65), 38017–38031. doi:10.1039/c9ra07057e

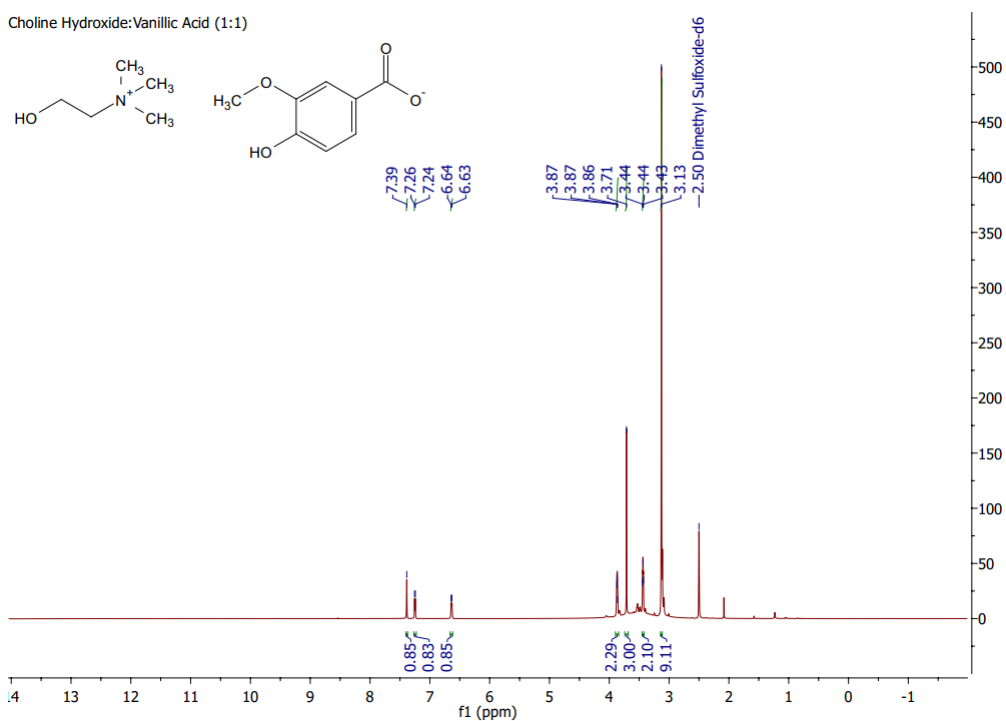
- [99] Hattori, T., Tagawa, H., Inai, M. et al. Transdermal delivery of nobiletin using ionic liquids. *Sci Rep* 9, 20191 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56731-1>
- [100] Nurunnabi, M., Ibsen, K. N., Tanner, E. E. L., & Mitragotri, S. (2019). Oral ionic liquid for the treatment of diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201914426. doi:10.1073/pnas.1914426116
- [101] Peiretti, F., Valéro, R., & Govers, R. (2020). Is ionic choline and geranate (CAGE) liquid caging diet-derived fat, limiting its absorption? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 202000032. doi:10.1073/pnas.2000032117
- [102] Jorge, L. R., Harada, L. K., Silva, E. C., Campos, W. F., Moreli, F. C., Shimamoto, G., ... Balcão, V. M. (2020). Non-invasive Transdermal Delivery of Human Insulin Using Ionic Liquids: In vitro Studies. *Frontiers in Pharmacology*, 11. doi:10.3389/fphar.2020.00243
- [103] Ko, J, Mandal, A, Dhawan, S, Shevachman, M, Mitragotri, S, Joshi, N. Clinical translation of choline and geranic acid deep eutectic solvent. *Bioeng Transl Med*. 2021; 6:e10191. <https://doi.org/10.1002/btm2.10191>
- [104] Takeda J, Iwao Y, Karashima M, Yamamoto K, Ikeda Y. Structural Evaluation of the Choline and Geranic Acid/Water Complex by SAXS and NMR Analyses. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2021 Feb;7(2):595-604. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.0c01324.
- [105] Leah Burrows, Harvard John A. Paulson, School of Engineering and Applied Sciences, 2021, February 10, Ionic liquid formulation can uniformly deliver chemotherapy to tumors while destroying cancerous tissue in preclinical studies. Discovery could solve a problem that has long plagued drug delivery, Press contact, <https://www.seas.harvard.edu/news/2021/02/ionic-liquid-formulation-can-uniformly-deliver-chemotherapy-tumors-while-destroying#>
- [106] MITRAGOTRI; Samir; et al., Applicant: PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE, THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA, filed on 2020-09-17, Ionic Liquids For Internal De-livery, U.S. Patent Office, Application Number: 20200289421 16/762361
- [107] Li, J., Wang, Z., Yao, S., & Song, H. (2020). Aqueous solubilization and extraction of curcumin enhanced by imidazolium, quaternary ammonium, and tropine ionic liquids, and insight of ionic liquids-curcumin interaction. *Journal of Molecular Liquids*, 113906. doi:10.1016/j.molliq.2020.113906
- [108] Falleh, H., Ksouri, R., Lucchessi, M.-E., Abdelly, C., & Magné, C. (2012). Ultrasound-Assisted Extraction: Effect of Extraction Time and Solvent Power on the Levels of Polyphenols and Antioxidant Activity of *Mesembryanthemum edule* L. Aizoaceae Shoots. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 11 (2), 243-249
- [109] Devi, A., Das, V. K., & Deka, D. (2017). Ginger extract as a nature based robust additive and its influence on the oxidation stability of biodiesel synthesized from non-edible oil. *Fuel*, 187, 306–314. doi:10.1016/j.fuel.2016.09.063
- [110] You, H., Ireland, B., Moeszinger, M., Zhang, H., Snow, L., Krepich, S., & Takagawa, V. (2018). Determination of bioactive nonvolatile ginger constituents in dietary supplements by a rapid and economic HPLC method: analytical method development and single-laboratory validation. *Talanta*. doi:10.1016/j.talanta.2018.10.075
- [111] Ismail, E. H., Sabry, D. Y., Mahdy, H., & Khalil, M. M. H. (2014). Synthesis and Characterization of some Ternary Metal Complexes of Curcumin with 1,10-phenanthroline and their Anticancer Applications. *Journal of Scientific Research*, 6(3). doi:10.3329/jsr.v6i3.18750

- [112] Rohman, Abdul & Sudjadi, & Devi, & Ramadhani, Diasti & Nugroho, Ardi. (2015). Analysis of curcumin in curcuma longa and Curcuma xanthorrhiza using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Research Journal of Medicinal Plant*. 9. 179-186. 10.3923/rjmp.2015.179.186.
- [113] Jorge, L. R., Harada, L. K., Silva, E. C., Campos, W. F., Moreli, F. C., Shimamoto, G., ... Balcão, V. M. (2020). Non-invasive Transdermal Delivery of Human Insulin Using Ionic Liquids: In vitro Studies. *Frontiers in Pharmacology*, 11. doi:10.3389/fphar.2020.00243
- [113] Jeong, K. M., Lee, M. S., Nam, M. W., Zhao, J., Jin, Y., Lee, D.-K., ... Lee, J. (2015). Tailoring and recycling of deep eutectic solvents as sustainable and efficient extraction media. *Journal of Chromatography A*, 1424, 10–17. doi:10.1016/j.chroma.2015.10.083
- [114] Vijayaraghavan, R., Thompson, B. C., MacFarlane, D. R., Kumar, R., Surianarayanan, M., Aishwarya, S., & Sehgal, P. K. (2010). Biocompatibility of choline salts as crosslinking agents for collagen based biomaterials. *Chem. Commun.*, 46(2), 294–296. doi:10.1039/b910601d

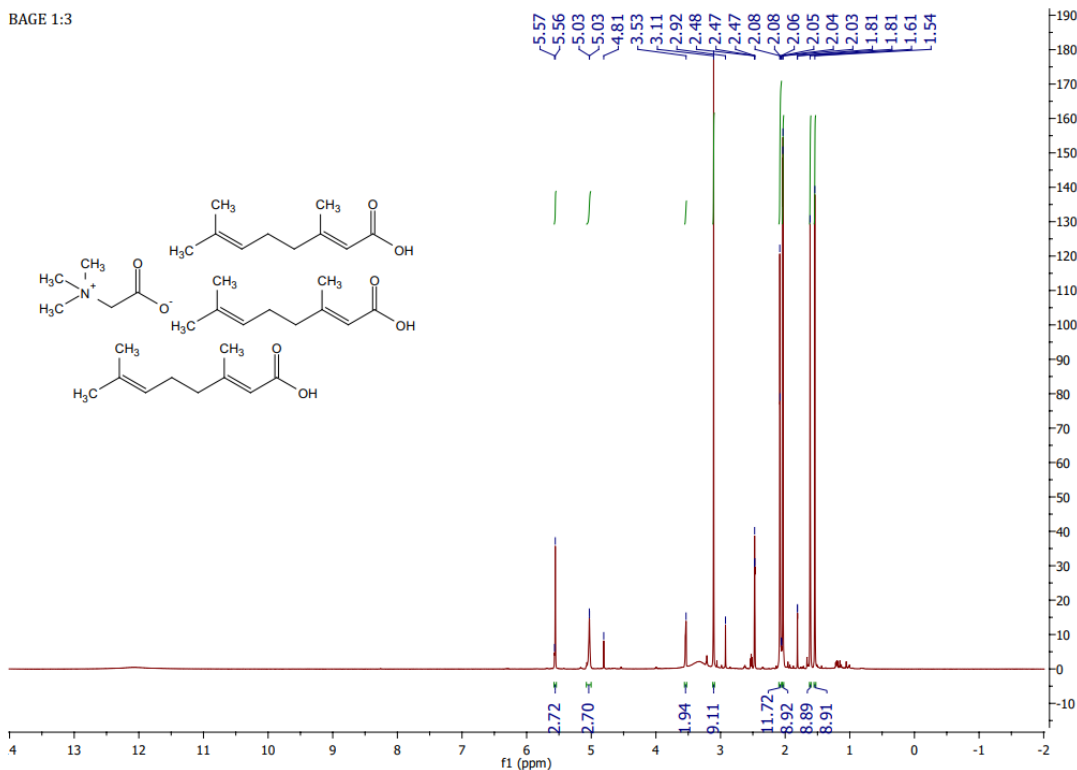
Παράρτημα I



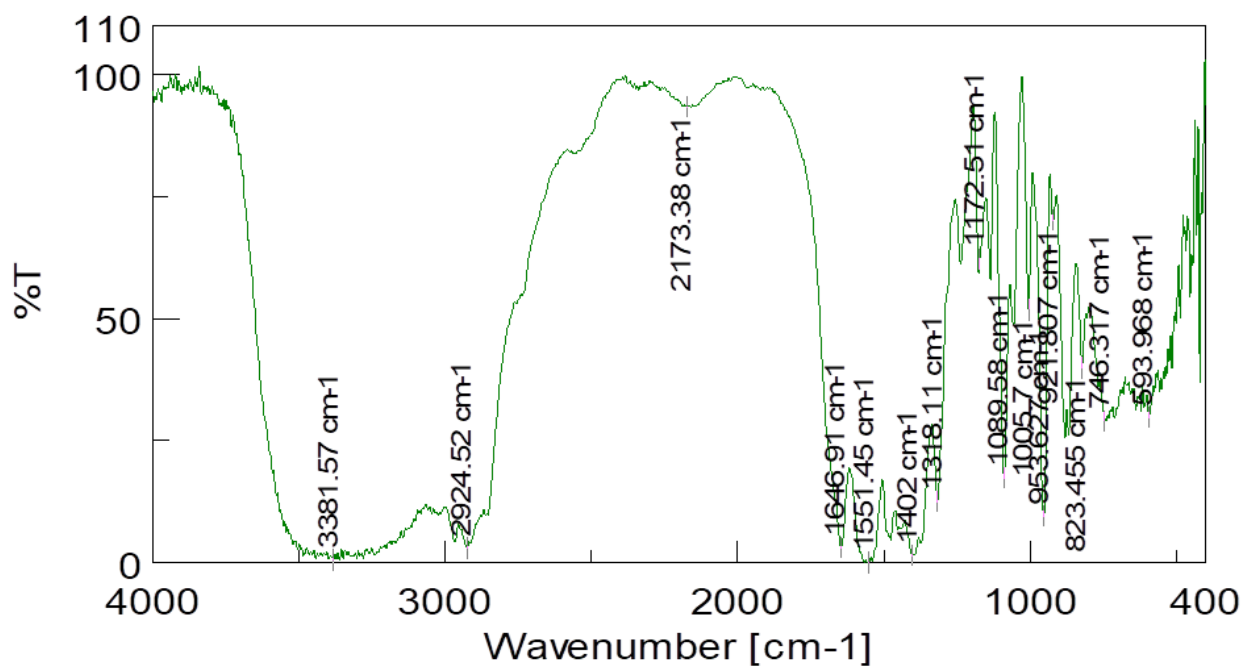
Γράφημα 18. Φάσμα ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) του ιοντικού υγρού ΙΥ₂ (Δωδεκανοϊκό οξύ).



Γράφημα 19. Φάσμα ^1H NMR (600MHz, DMSO-d_6) του ιοντικού υγρού ΙΥ₃ (Βανιλικό οξύ).

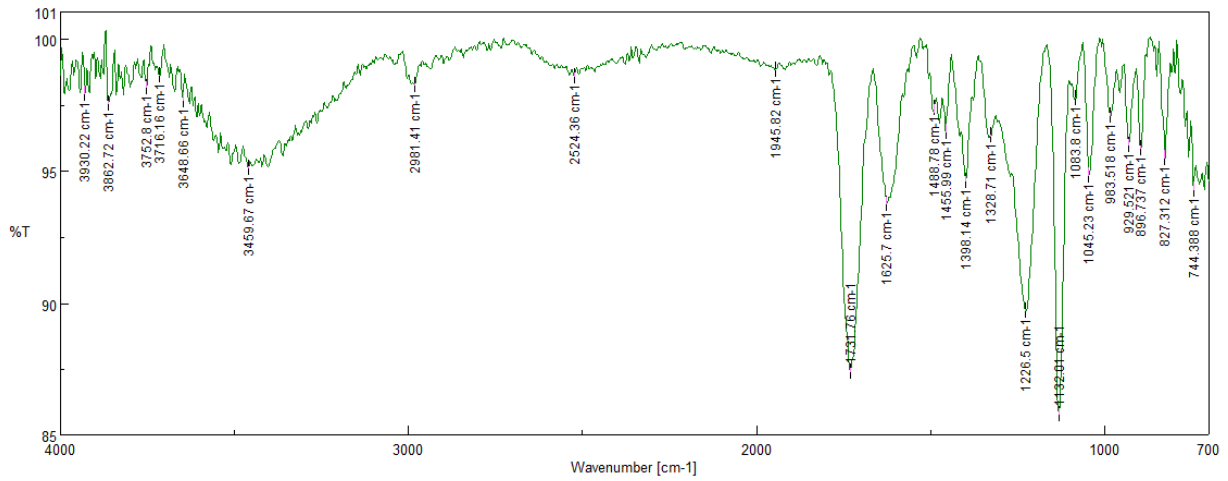


Γράφημα 20. Φάσμα ^1H NMR (600MHz, DMSO-d_6) για το BAGE 1:3.

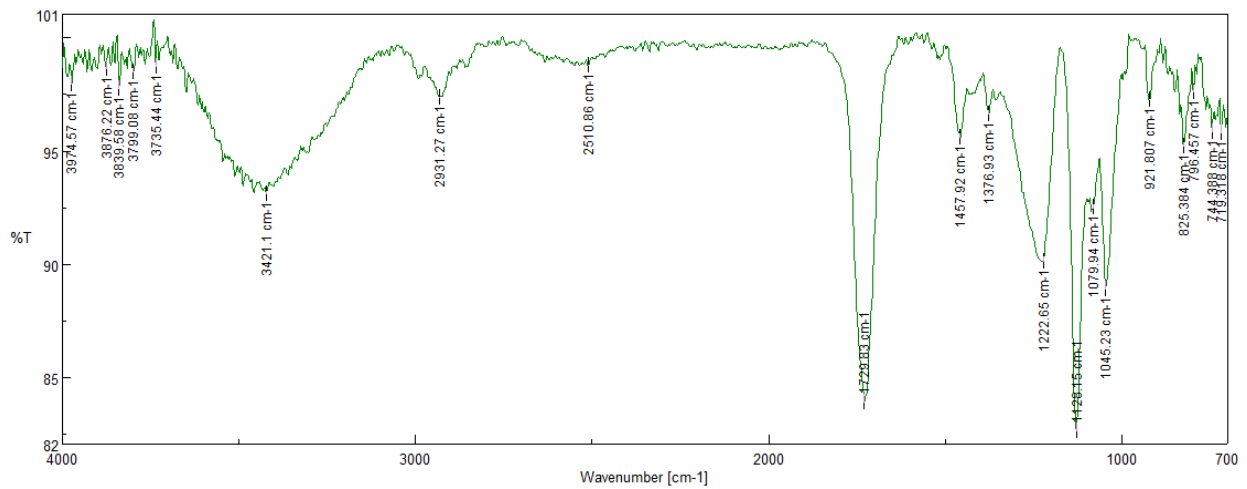


Γράφημα 21. Φάσμα IR του ιοντικού υγρού CAGE 1:1.

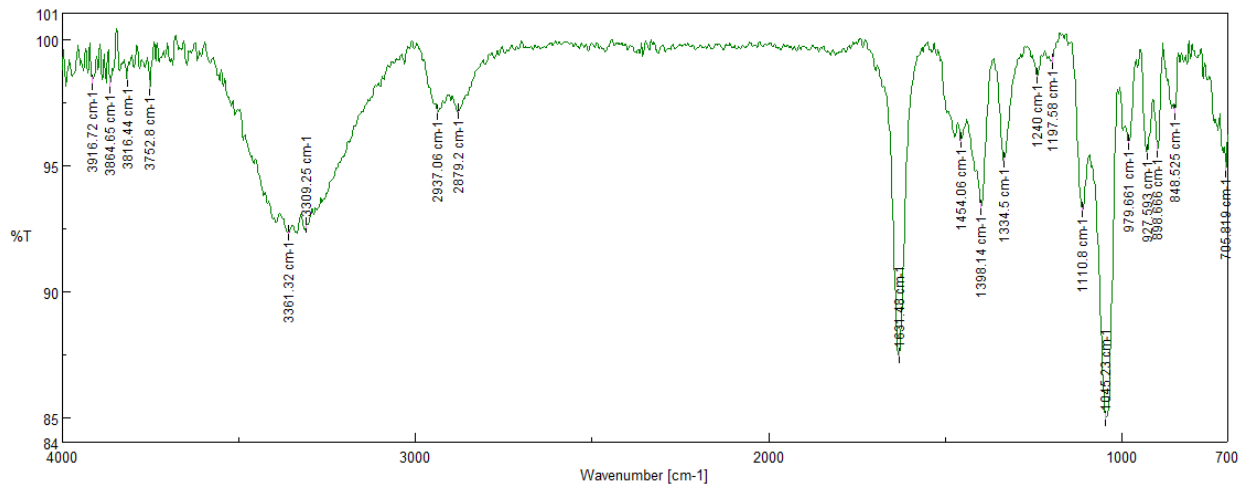
Παράρτημα II



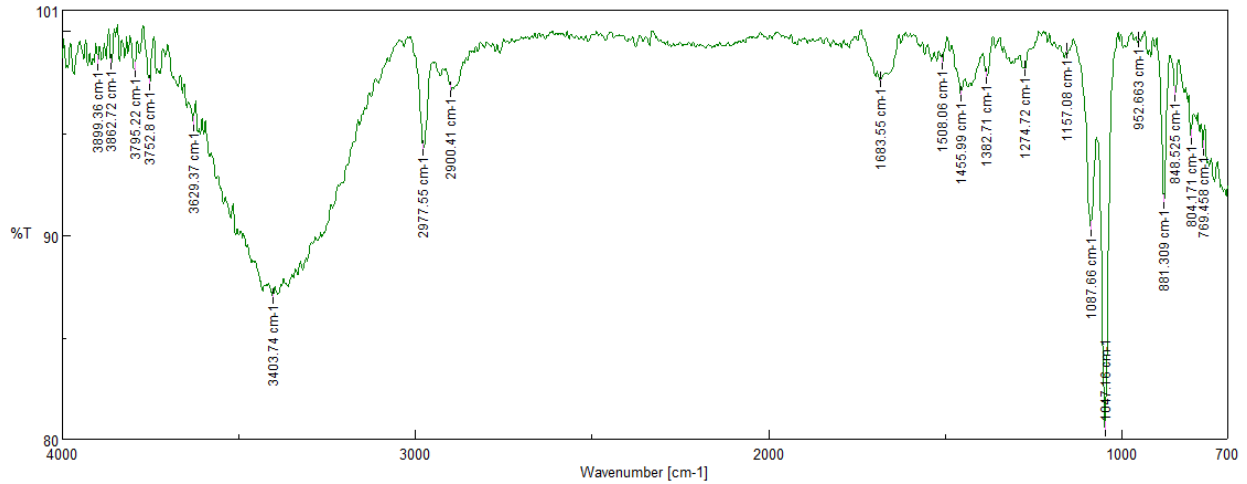
Γράφημα 22. Φάσμα FTIR (ATR) εκχυλίσματος E/Bet:LA:W.



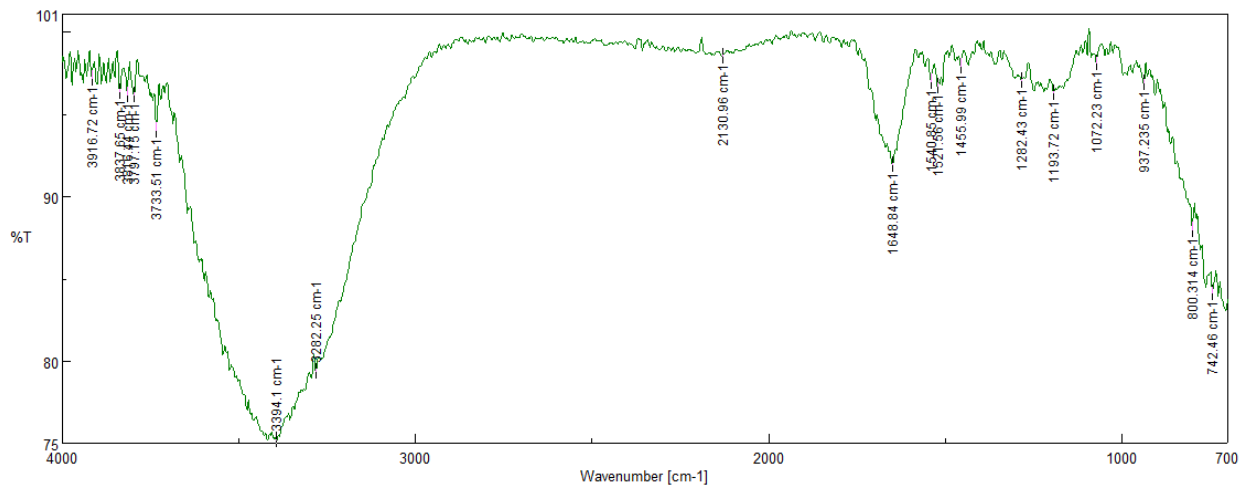
Γράφημα 23. Γράφημα 24. Φάσμα FTIR (ATR) εκχυλίσματος E/Glu:LA:W.



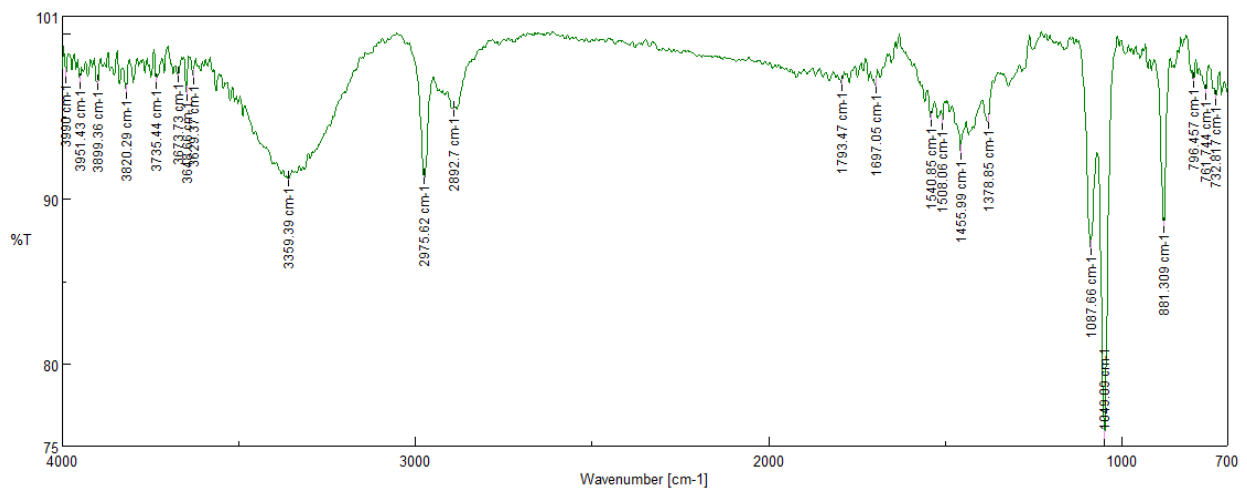
Γράφημα 25. Φάσμα FTIR (ATR) εκχυλίσματος E/Bet:Gly.



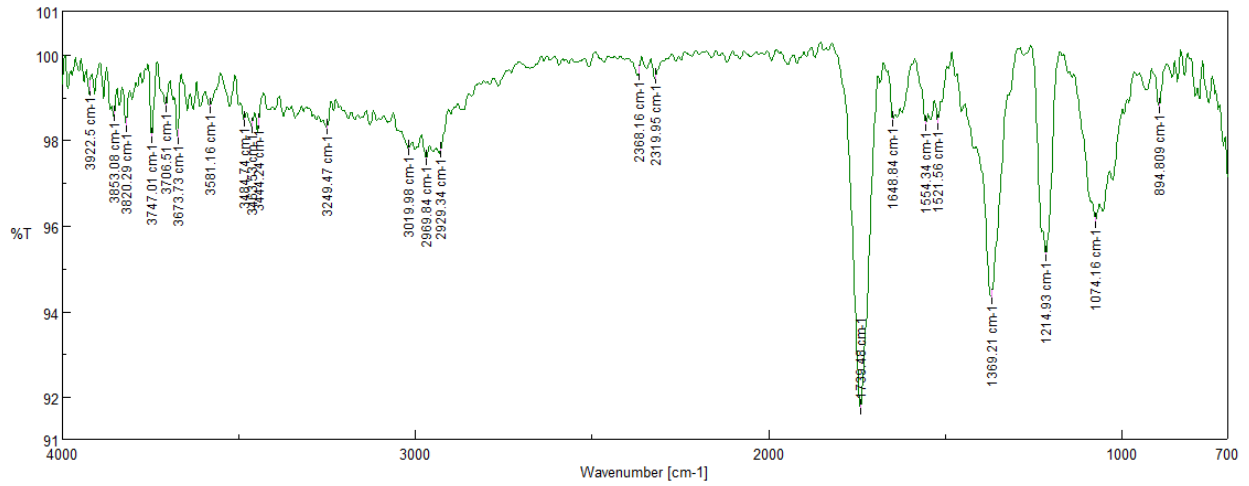
Γράφημα 26. Φάσμα FTIR (ATR) εκχυλίσματος E/EtOH:H₂O.



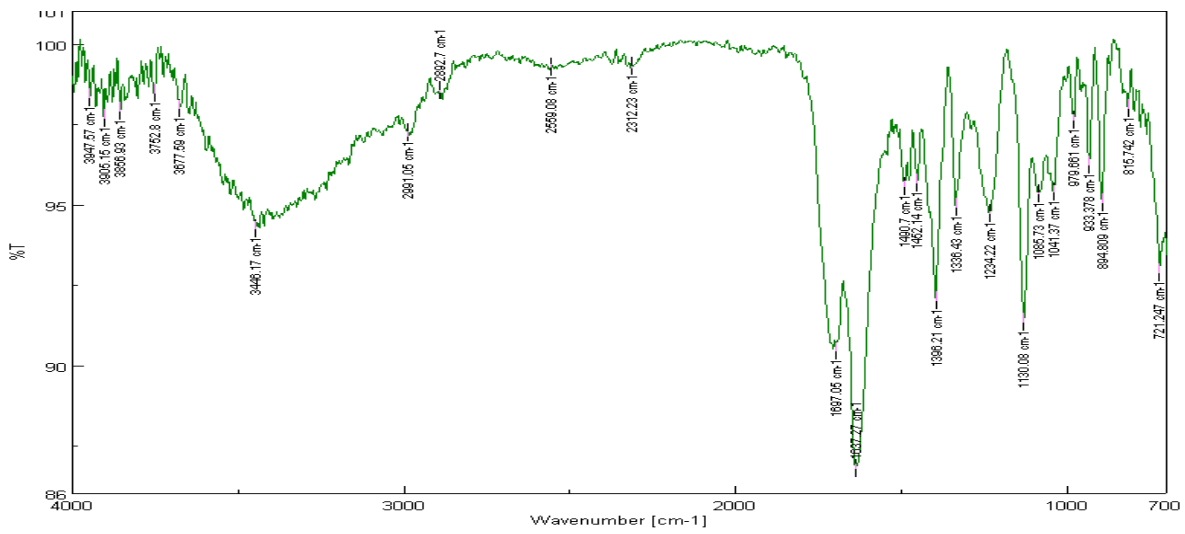
Γράφημα 27. Φάσμα FTIR (ATR) εκχυλίσματος E/H₂O.



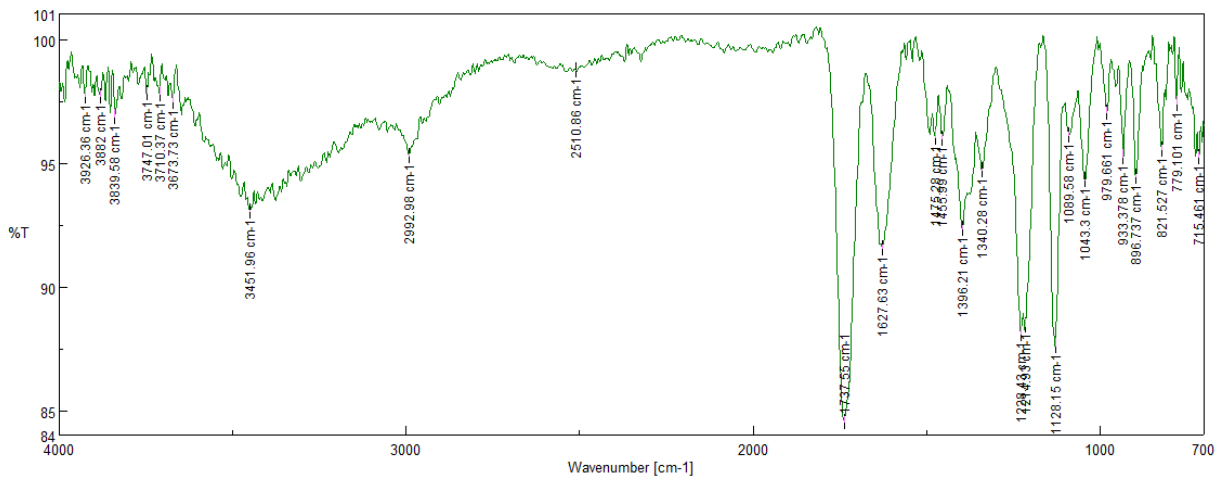
Γράφημα 28. Φάσμα FTIR (ATR) εκχυλίσματος E/EtOH.



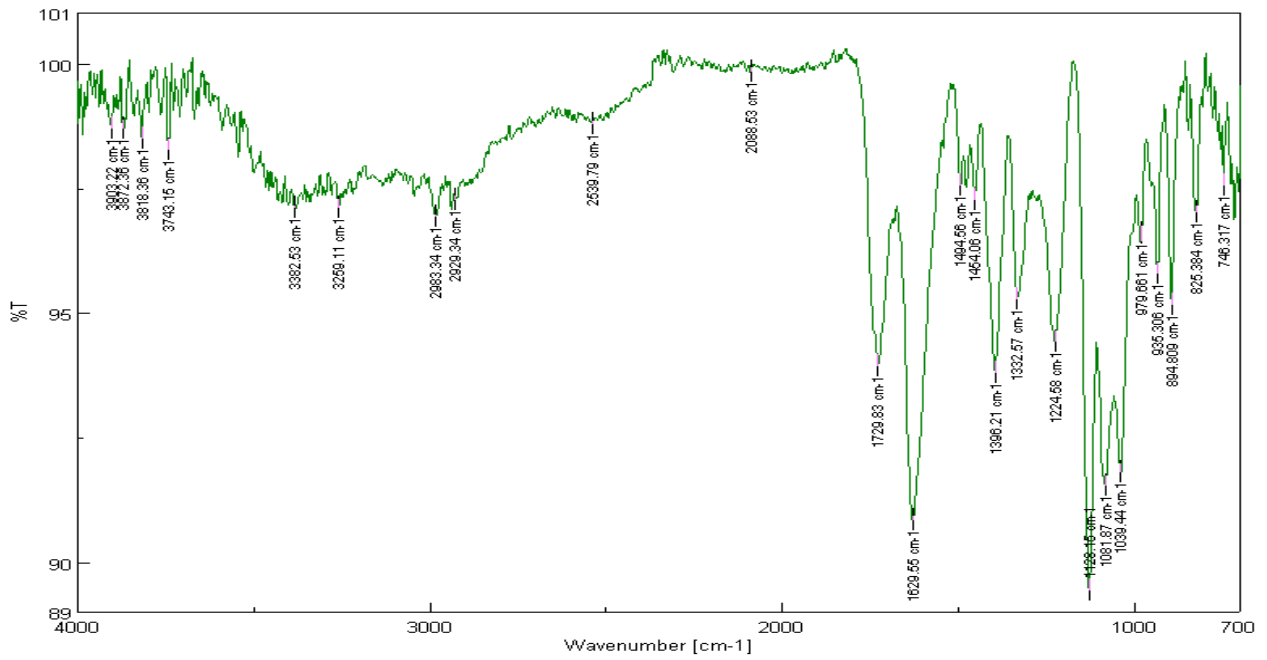
Γράφημα 29. Φάσμα FTIR (ATR) φιλμ (F₁) με οξικό οξύ για διάλυση της χιτοζάνης.



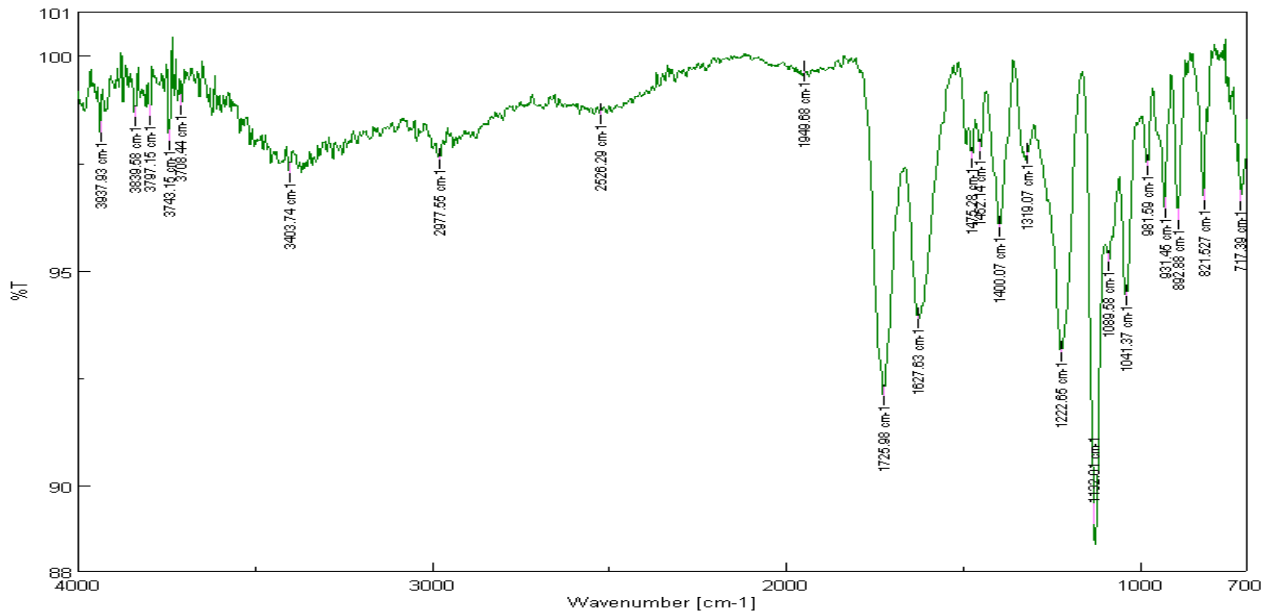
Γράφημα 30. Φάσμα FTIR (ATR) φιλμ (F₂) ενισχυμένο με 1% w/v Bet:LA:W.



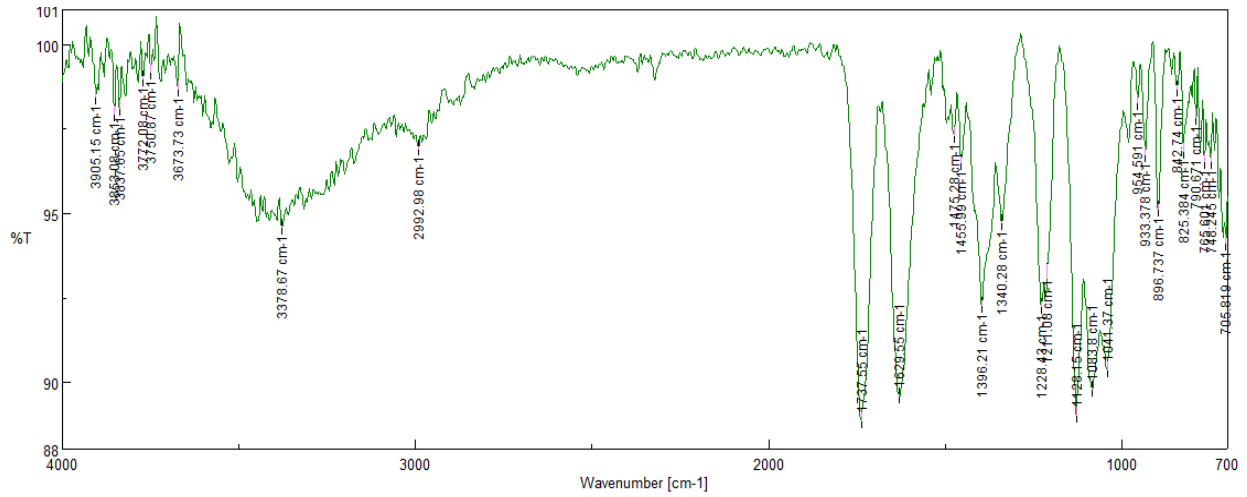
Γράφημα 31. Φάσμα FTIR (ATR) φιλμ (F₃) ενισχυμένο με 3% w/v Bet:LA:W.



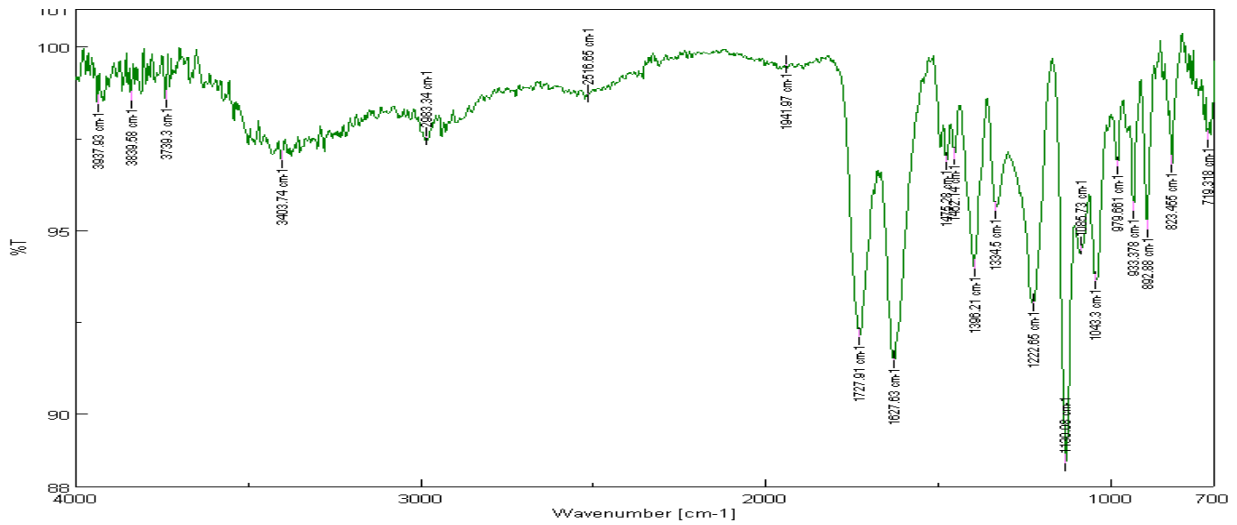
Γράφημα 32. Φάσμα FTIR (ATR) φιλμ (F₆) ενισχυμένο με 0.5% w/v Bet:LA:W.



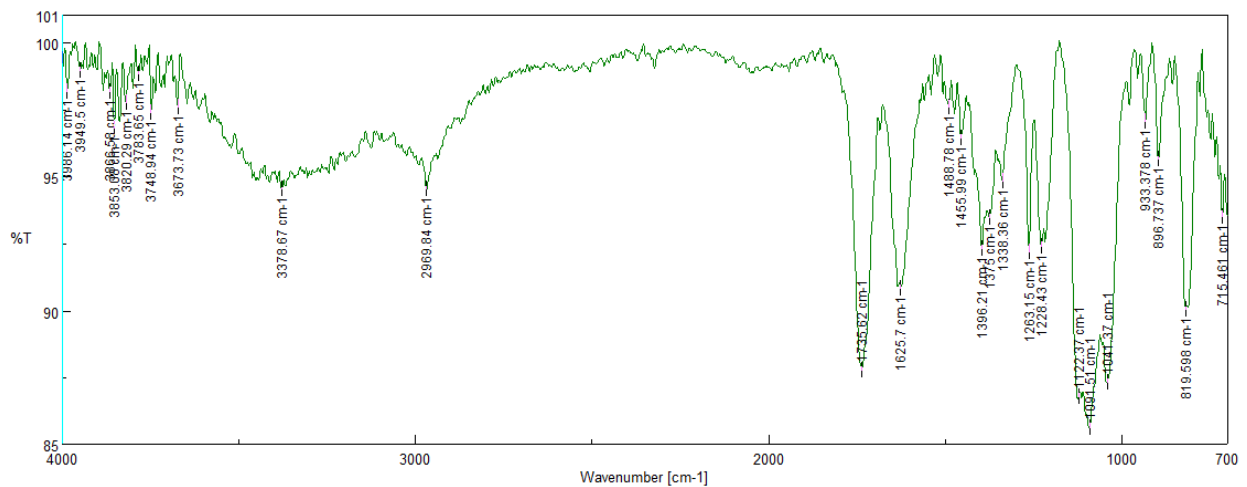
Γράφημα 33. Φάσμα FTIR (ATR) φιλμ (F₇) ενισχυμένο με 3% w/v Bet:LA:W.



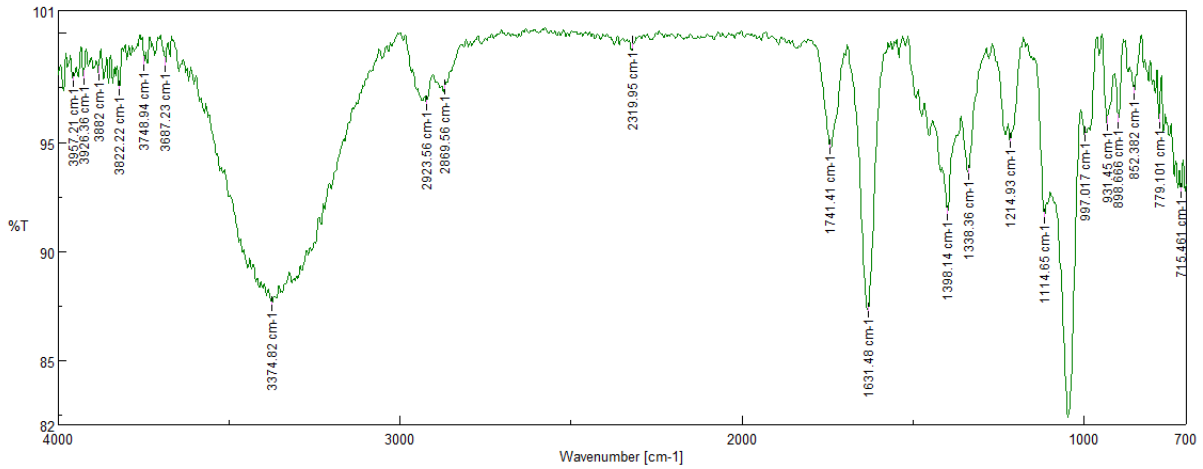
Γράφημα 34. Φάσμα FTIR (ATR) φιλμ (F₈) ενισχυμένο με 0.5% w/v εκχύλισμα E/Bet:LA:W.



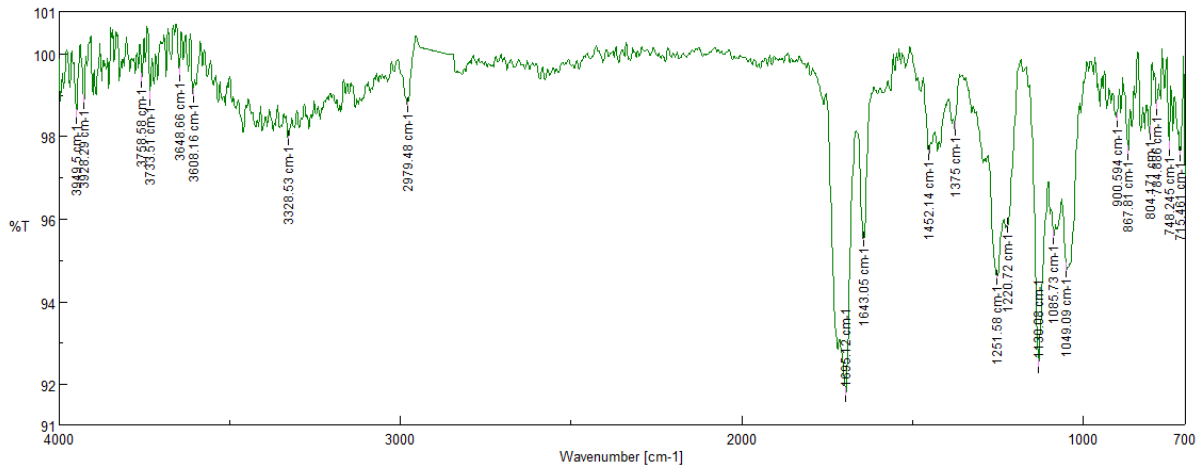
Γράφημα 35. Φάσμα FTIR (ATR) φιλμ (F₉) ενισχυμένο με 1% w/v εκχύλισμα E/Bet:LA:W.



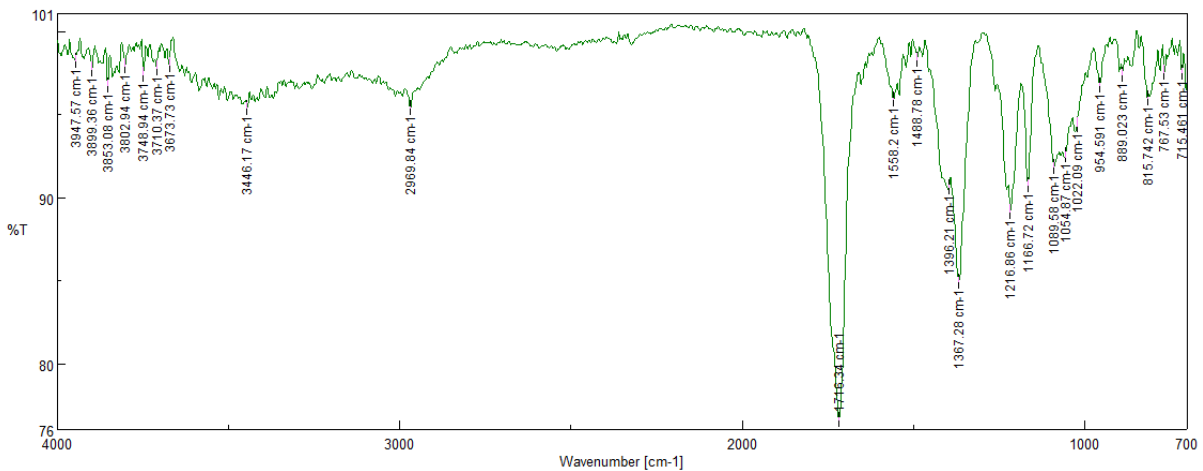
Γράφημα 36. Φάσμα FTIR (ATR) φιλμ (F₁₀) ενισχυμένο με 1% w/v εκχύλισμα GT₁.



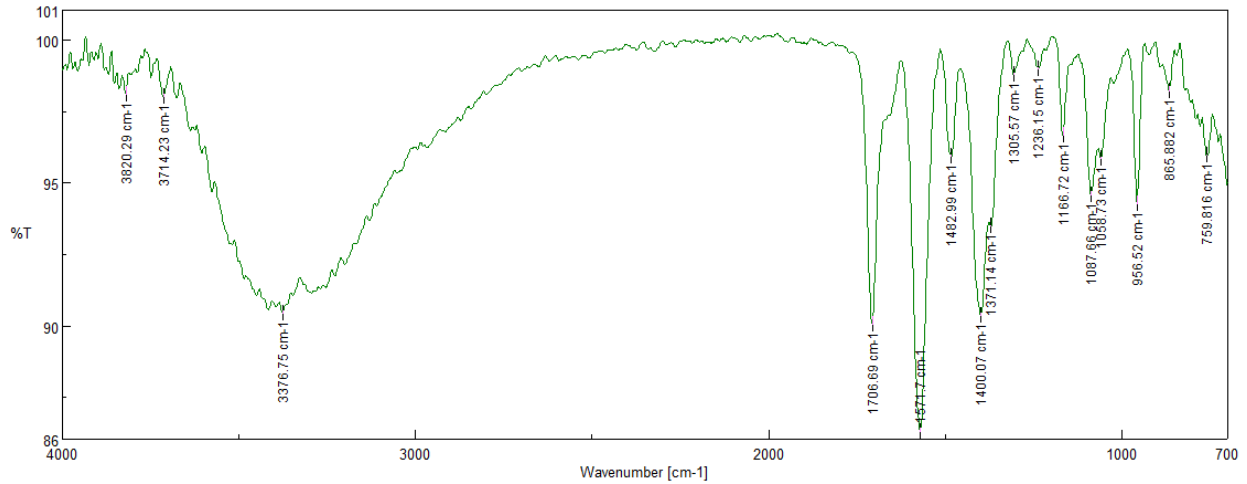
Γράφημα 37. Φάσμα FTIR (ATR) φιλμ (F₁₁) ενισχυμένο με 0.5% w/v εκχύλισμα E/Bet:Gly.



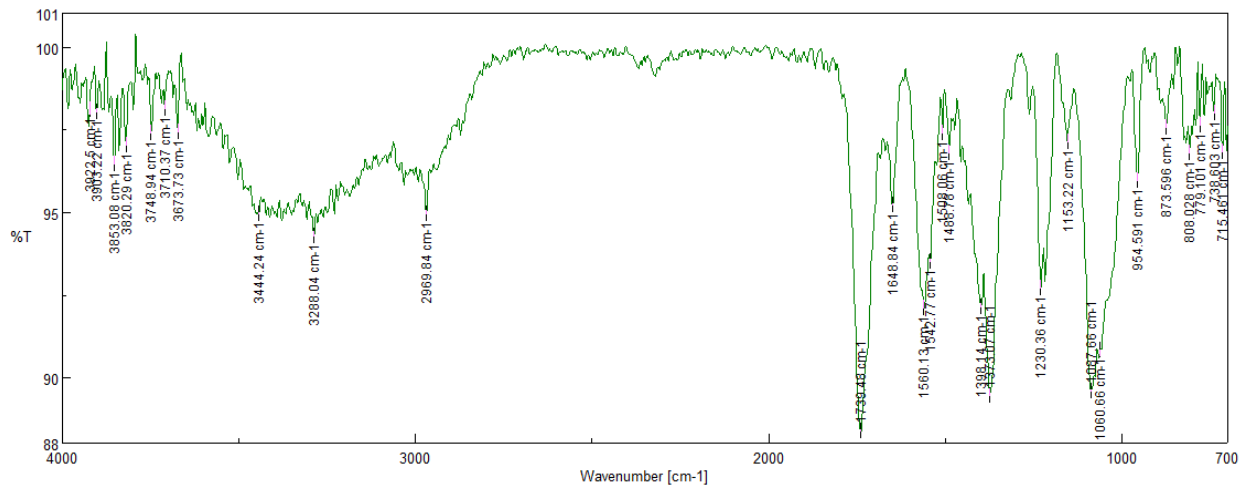
Γράφημα 38. Φάσμα FTIR (ATR) φιλμ (F₁₂) ενισχυμένο με 0.5% w/v εκχύλισμα E/Glu:LA:W.



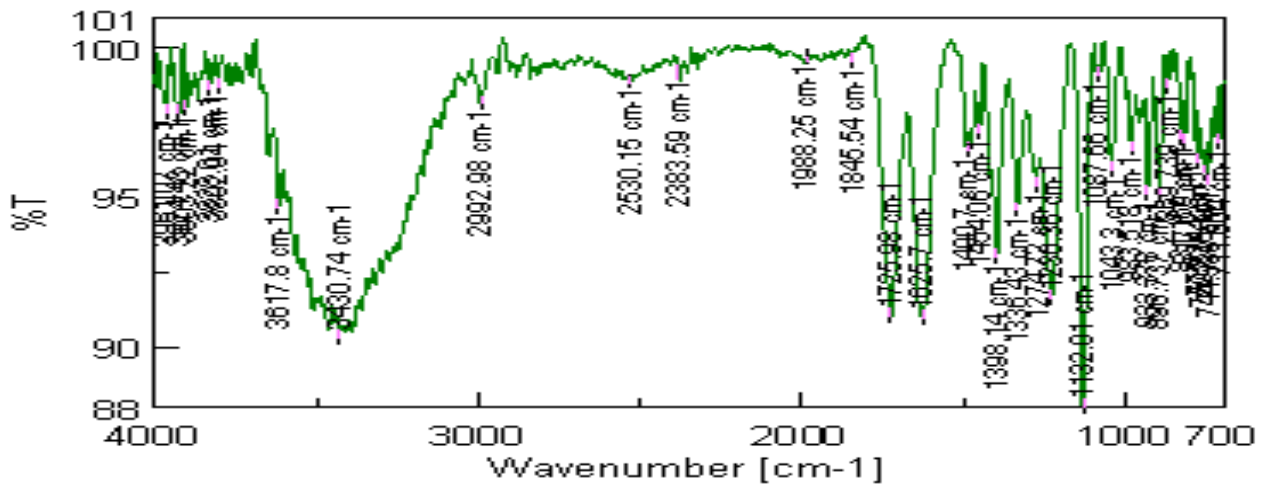
Γράφημα 39. Φάσμα FTIR (ATR) φιλμ (F₁₃) ενισχυμένο με 1% w/v με το ιοντικό υγρό *Choline Hydroxide:Levulinic Acid (1:1)*.



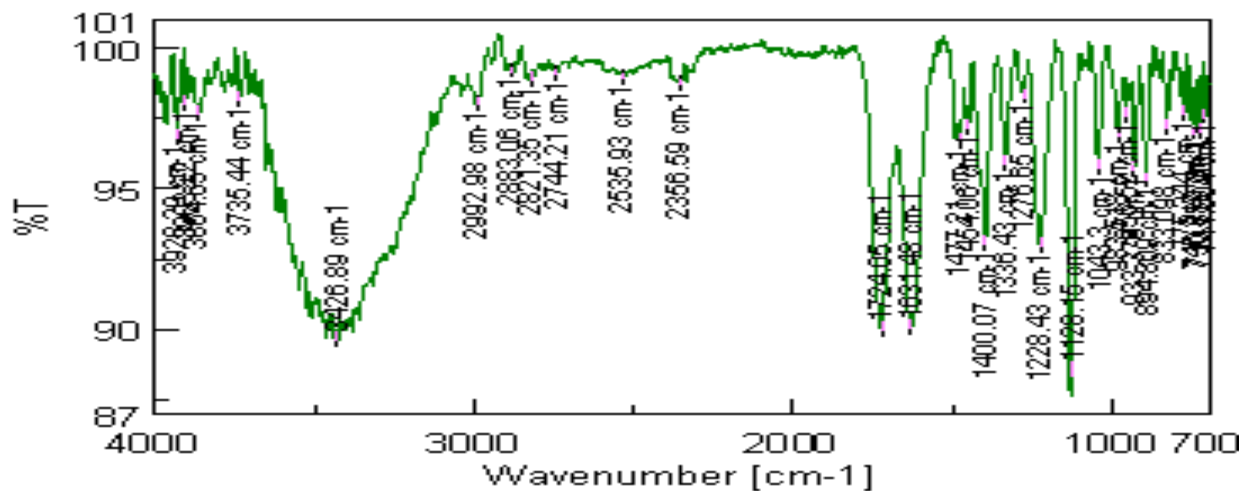
Γράφημα 40. Φάσμα FTIR (ATR) φιλμ (F₁₄) ενισχυμένο με 1% w/v με το ιοντικό υγρό Choline Hydroxide:Levulinic Acid (1:1).



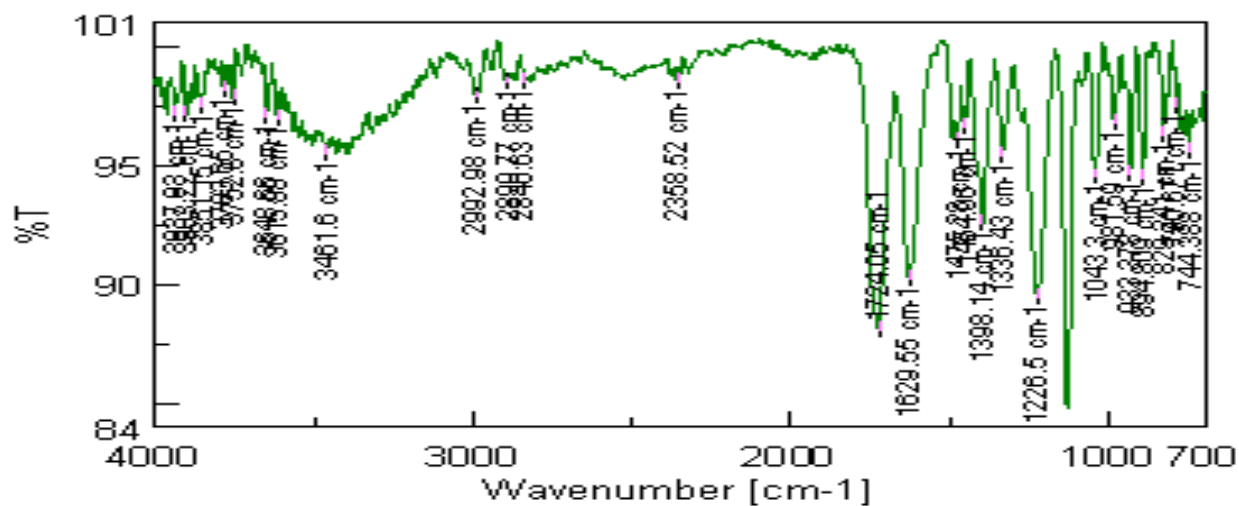
Γράφημα 41. Φάσμα FTIR (ATR) φιλμ (F₁₅) ενισχυμένο με 1% w/v CAGE (1:2).



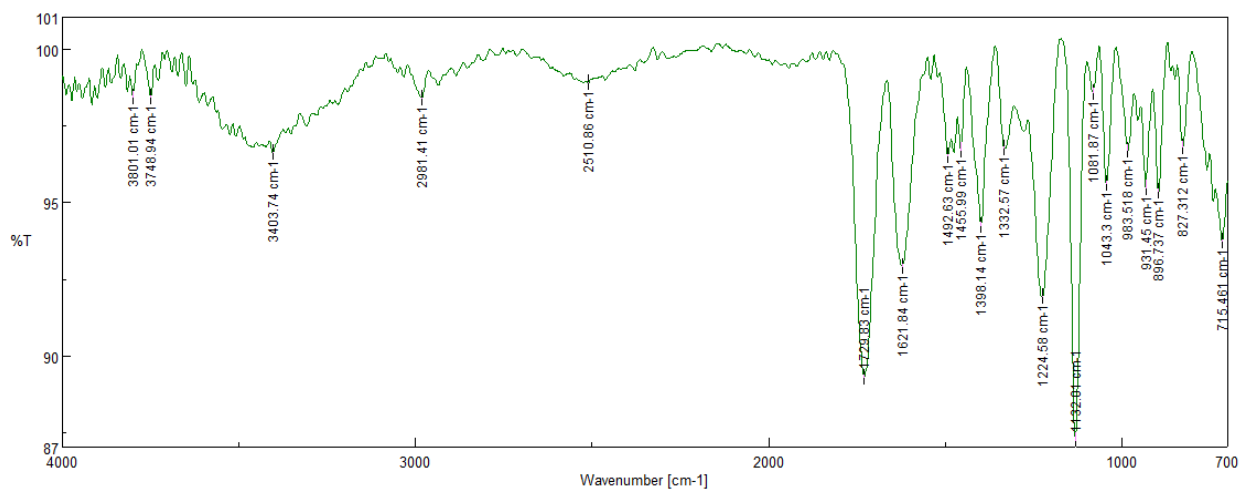
Γράφημα 42. Φάσμα FTIR (ATR) εκχυλίσματος GT₁.



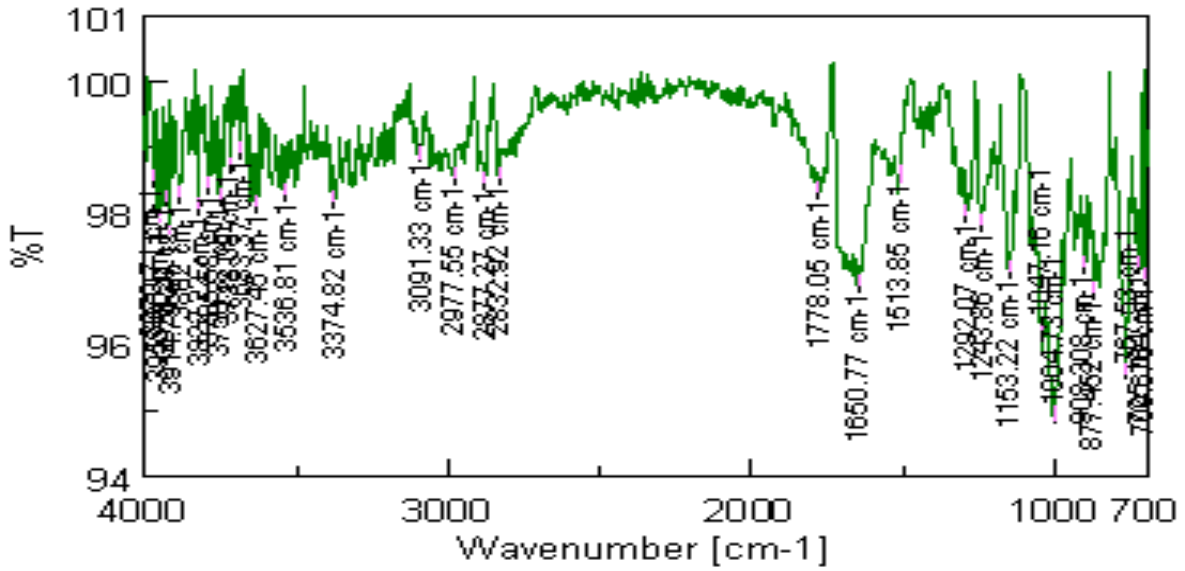
Γράφημα 43. Φάσμα FTIR (ATR) εκχυλίσματος GT₂.



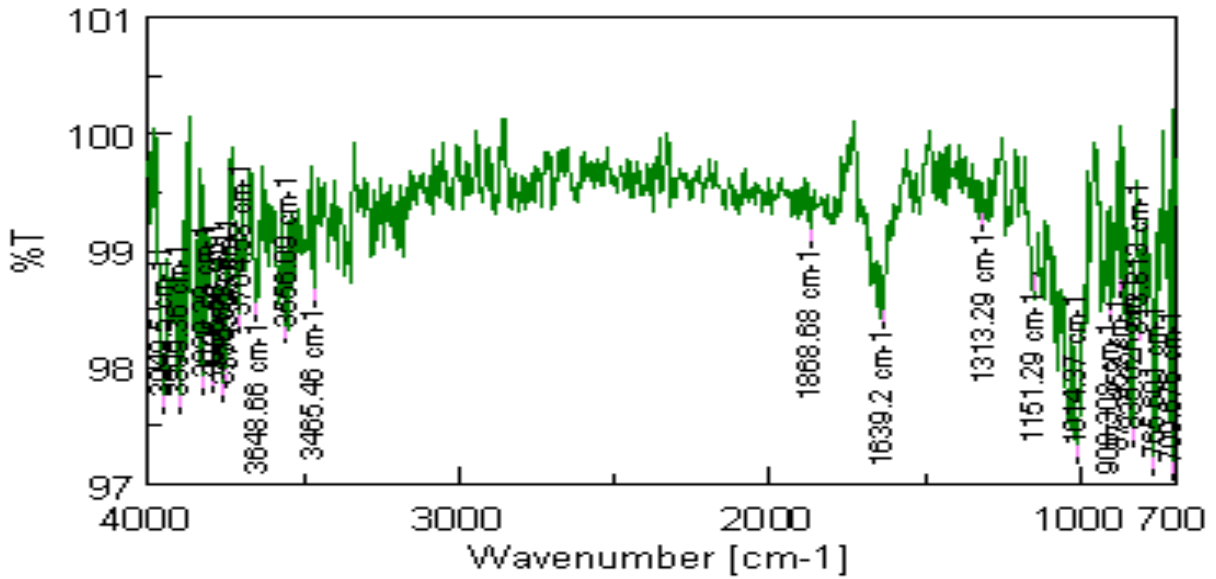
Γράφημα 44. Φάσμα FTIR (ATR) εκχυλίσματος GT₃.



Γράφημα 45. Φάσμα FTIR (ATR) εκχυλίσματος GT₄.

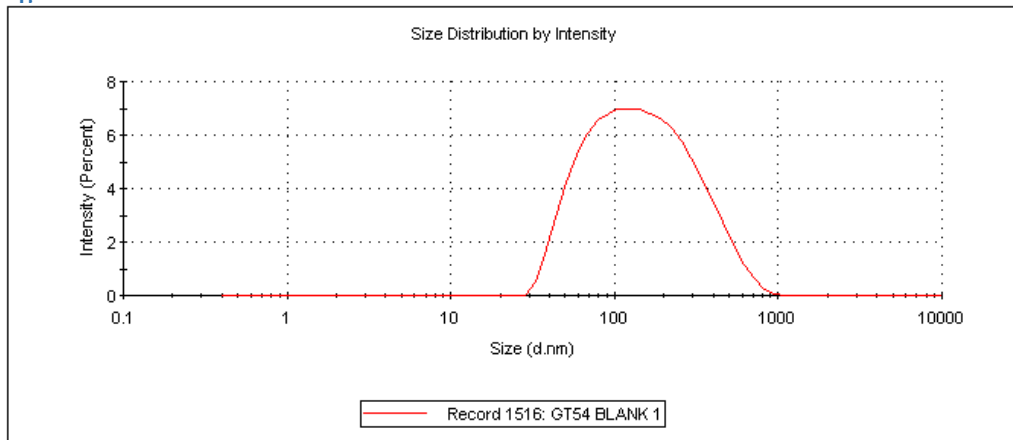


Γράφημα 46. Φάσμα FTIR για το φρέσκο τζίντζερ.

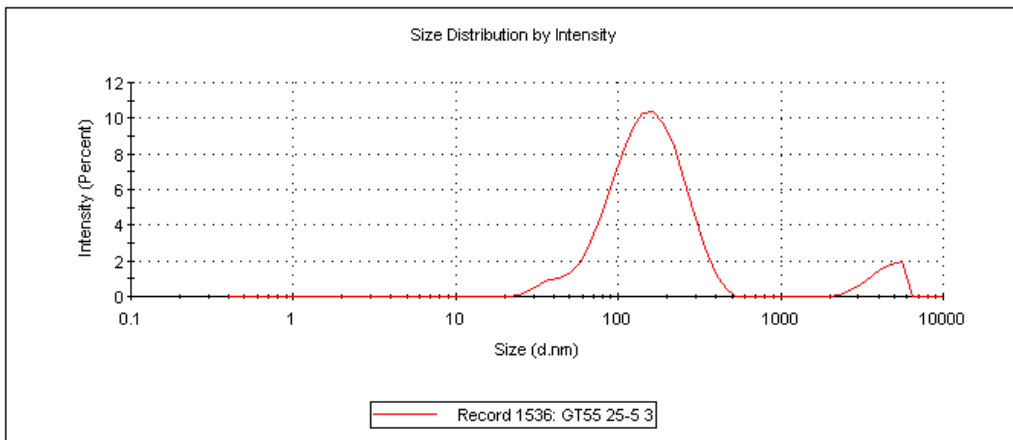


Γράφημα 47. Φάσμα FTIR για το ξηρό, θερμικά επεξεργασμένο, εμπορικό τζίντζερ.

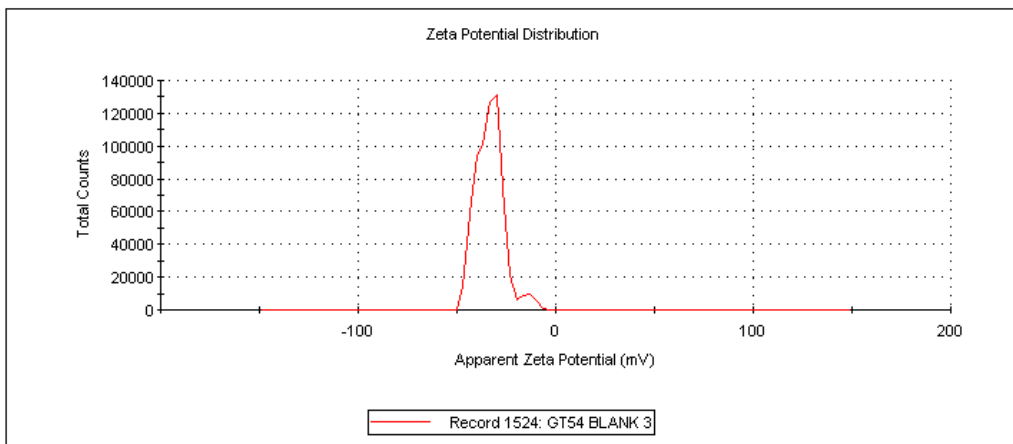
Παράρτημα III



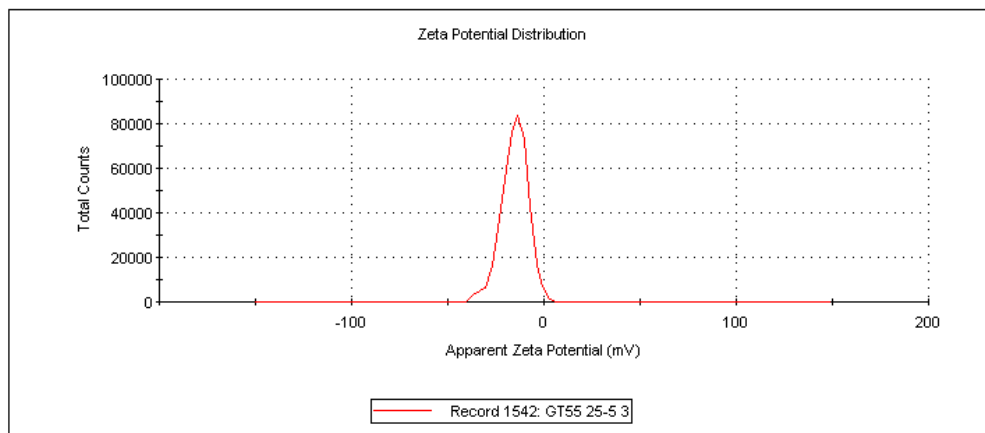
Γράφημα 48. Κατανομή μεγέθους σωματιδίων δείγματος (τυφλό) Micelles_Blank που περιέχει μόνο το φορέα CAGE (1:2).



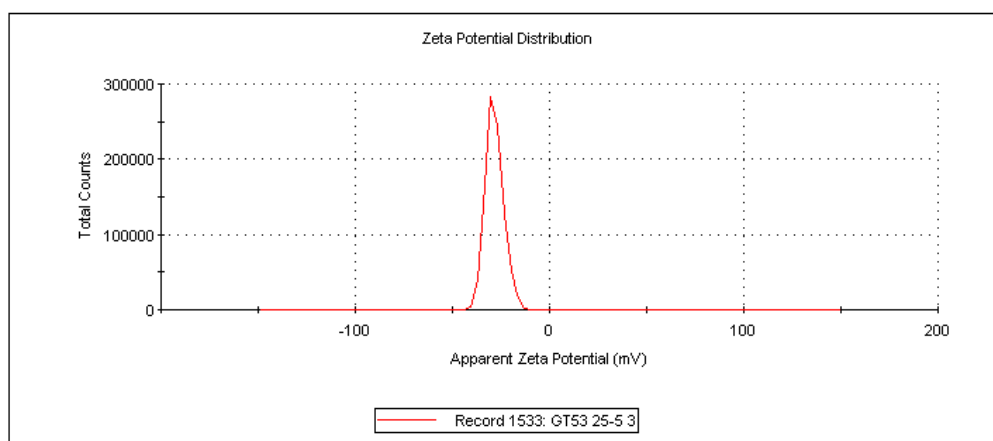
Γράφημα 49. Κατανομή μεγέθους σωματιδίων (αραιού σε κουρκουμίνη) δείγματος Micelles_Cage_cur/5.



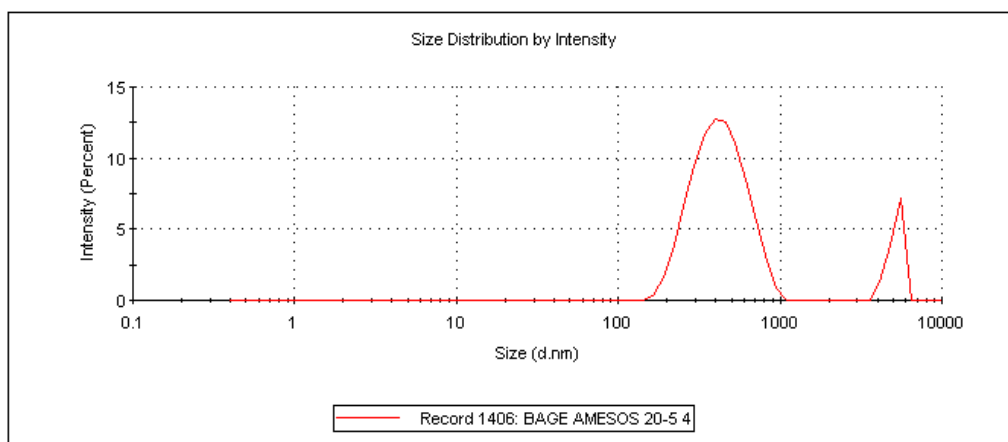
Γράφημα 50. Αποτελέσματα ζ-δυναμικού για το (τυφλό) δείγμα Micelles_Blank που περιέχει μόνο το φορέα CAGE (1:2).



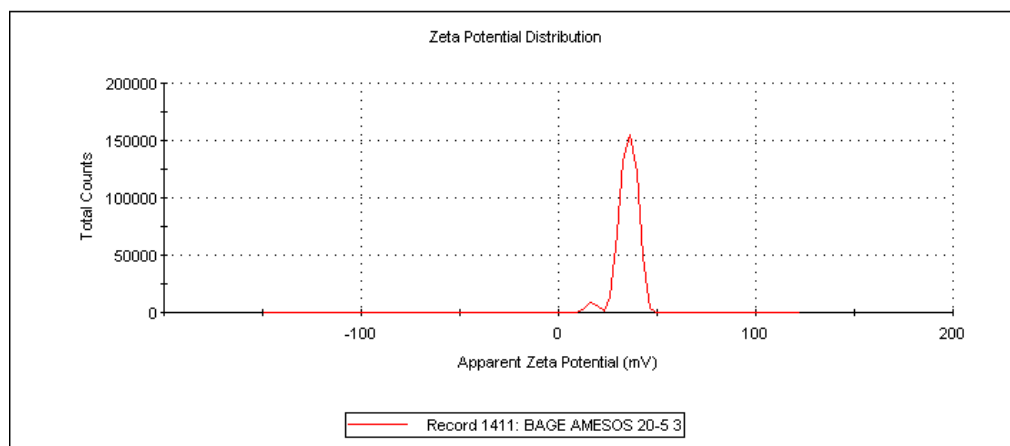
Γράφημα 51. Αποτελέσματα ζ-δυναμικού (αραιού) δείγματος Micelles_Cage_cur/5.



Γράφημα 52. Αποτελέσματα ζ-δυναμικού για το (πυκνό) δείγμα Micelles_Cage_cur/20.



Γράφημα 53. Κατανομή μεγέθους σωματιδίων BAGE (1:3.5).



Γράφημα 54. Αποτελέσματα ζ-δυναμικού για το BAGE (1:3.5).